

Generierung, Validierung und Charakterisierung einer naiven single chain Fab Bibliothek

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Florian Tomszak
aus Hannover

1. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referent:	Professor Dr. Jürgen Bode
eingereicht am:	15. September 2014
mündliche Prüfung (Disputation) am:	02. Juni 2015
Druckjahr 2016	

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Antikörper	1
1.1.1	Geschichte	1
1.1.2	Antikörperklassen und Antikörperaufbau	2
1.1.3	Organisation und Expression von Immunglobulinen	4
1.1.4	Antikörperformate	5
1.1.5	Konvertierung von Antikörpern	6
1.1.6	Antikörpergenerierung	8
1.2	Antikörperphagendisplay	13
1.2.1	Biologie von Bakteriophagen	13
1.2.2	Phagenvektoren	14
1.2.3	Antikörpergenbibliotheken	15
1.2.4	Selektion von Antikörperfragmenten mittels Phagendisplay	20
1.3	Produktionssysteme für Antikörper	22
1.3.1	Bakterielle Expression	22
1.3.2	Säugerzellexpression	22
2	Zielsetzung der Arbeit	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Material	24
3.1.1	Geräte	24
3.1.2	Computerprogramme und Datenbanken	25
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	25
3.1.4	Kits und Säulen	26
3.1.5	Enzyme und zugehörige Puffer	26
3.1.6	Antiseren und kommerzielle Antikörper	26
3.1.7	Chemikalien, Lösungen und Puffer	26
3.1.8	Mikroorganismen und Zelllinien	29
3.1.9	Medien und Supplemente	29
3.1.10	Vektoren	30
3.1.11	Oligonukleotide	30
3.1.12	Sonstiges	31
3.2	Methoden	32
3.2.1	Allgemeines	32
3.2.2	Molekulargenetische Methoden	32
3.2.3	Mikrobiologische Methoden	34
3.2.4	Biochemische und –physikalische Methoden	36
3.2.5	Zellbiologische Methoden	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Aufbau des scFab-Vektors	40
4.1.1	Codonoptimierung für <i>E. coli</i>	40
4.2	Vorarbeiten zur Klonierung einer naiven scFab Bibliothek	42
4.3	Klonierung von zwei scFab Testbibliotheken und Analysen	42
4.3.1	Bestimmung der Transformationseffizienz und Diversität	42
4.3.2	Insert-Rate	43
4.3.3	Verpackung der Testbibliotheken	44
4.3.4	Antikörperpräsentation	45

4.3.5	Panning	45
4.3.6	Charakterisierung der Binder	46
4.4	Klonierung einer naiven scFab-Phagenbibliothek und Analysen	49
4.4.1	Bestimmung der Transformationseffizienz und Diversität	49
4.4.2	Insert Rate	49
4.4.3	Verpackung im Kleinmaßstab und pIII Fusionsprotein der Subbibliotheken	50
4.4.4	Verpackung im Großmaßstab und Nachweis der Fusionsbanden	51
4.4.5	Bibliothekendiversität	52
4.5	Selektion von Antikörperfragmenten mittels Phagendisplay	53
4.5.1	Verwendete Antigene und Eigenschaften	53
4.6	Untersuchung von Parametern des Selektionsprozesses	56
4.6.1	Automatisierung	56
4.6.2	Elution von scFab Antikörperphagen	57
4.6.3	Variation von Helferphagen in der scFab Antikörperselektion	58
4.6.4	Spicken der Bibliothek	58
4.6.5	Delta N1 und N2	59
4.7	Untersuchung von Parametern der Phagenverpackung	61
4.7.1	Helferphagen	61
4.7.2	Temperatur	62
4.8	Selektion von spezifischen Antikörperphagen mittel ELISA	63
4.8.1	Produktion	63
4.8.2	Phagen ELISA	64
4.8.3	ELISA mit dem Nachweis über Europium	64
4.9	Charakterisierung von scFab	65
4.9.1	Produktion von „model scFabs“	65
4.9.2	Natives PAGE und Blotting	68
4.10	Charakterisierung von scFab Phagen	69
4.10.1	Messungen zur Antigenbindung von Antikörperphagen durch SPR	69
4.10.2	Fluoreszenzmikroskopie	71
4.10.3	TEM Aufnahmen	72
5	Diskussion	74
5.1	Vorarbeiten zur Generierung einer naiven scFab-Bibliothek	75
5.1.1	Design des Antikörperphagendisplayvektors	75
5.1.2	Sammeln von Spendermaterial und Isolation von relevanten Genen	75
5.1.3	Generierung von zwei scFab-Testbibliotheken und Analysen	76
5.2	Die naive scFab-Phagenbibliothek	77
5.2.1	Klonierung von scFab Phagen Bibliotheken	77
5.2.2	Selektion von Antikörperfragmenten mittels Phagendisplay	78
5.2.3	Untersuchungen von Parametern des Selektionsprozesses	80
5.2.4	Untersuchung von Eigenschaften des scFab-Formats	80
5.3	Fazit	82
6	Ausblick	84
7	Zusammenfassung	85
8	Summary	86
9	Abkürzungsverzeichnis	87
10	Abbildungsverzeichnis	90
11	Tabellenverzeichnis	94
12	Literaturverzeichnis	95

1 Einleitung

1.1 Antikörper

1.1.1 Geschichte

Es wird vermutet, dass an Heiligabend 1891 die erste passive Immunisierung durchgeführt wurde¹. Ein kleiner Junge soll durch die Injektion eines Diphtherieantitoxins geheilt worden sein, was jedoch nicht eindeutig durch Quellen zu belegen ist². Die passive Immunisierung ist vor allem auf die Forschungsarbeiten von Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato zurückzuführen. Diese veröffentlichten 1890, dass das Serum eines zuvor mit Diphtherietoxin immunisierten Kaninchens neutralisierende Wirkungen auf ein Tier hat, welches eine tödlichen Dosis injiziert bekommen hatte³. Des Weiteren gelang es Behring und Kitasato diese Ergebnisse für das Tetanustoxin erfolgreich zu reproduzieren. Die Farbwerke Höchst begannen 1893 mit der Immunisierung von Schafen, um den großen Bedarf an Antiseren zu decken⁴. Frankreich produzierte Diphtherie-Antiseren in Pferden, was dazu führte, dass in Paris 1894 die Sterblichkeit durch Diphtherie von über 50 % auf 25 % sank⁵. Im selben Jahr wurden zudem in Großbritannien erste Tests auf Grundlage von Behrings Experimenten durchgeführt und erfolgreich abgeschlossen⁶. Die sogenannte Serumkrankheit nach Gabe von Pferdeserum, gekennzeichnet durch Fieber, Hautausschläge und Gelenkschmerzen, verringerte jedoch den Erfolg. Behring führte weitere Tests zur Fällung der Proteinfraction im Serum durch und konnte dadurch die Nebeneffekte der Serumkrankheit reduzieren, jedoch nie vollständig eliminieren.

Paul Ehrlich ermöglichte durch die Etablierung eines auf Meerschweinchenimmunisierung basierenden Nachweissystems das frühzeitige Erkennen von Batch- zu Batch-Unterschieden bei der Großproduktion von Antiseren^{7,8}.

Später war es Ehrlich, der seine Seitenkettentheorie von Toxizität postulierte. Die Theorie besagte, dass Toxine Seitenketten ausbilden, die dafür verantwortlich sind, dass im Organismus eine Immunantwort hervorgerufen wird, welche dem heutigen Verständnis von Antikörpern entspricht (Abbildung 1)⁹.

Auch heute noch wird diese Art der passiven Immunisierung angewandt^{5,10}. So wurden Versuche durchgeführt, um AIDS Patienten durch die Gabe von Donorimmunglobulinen passiv zu immunisieren¹¹.

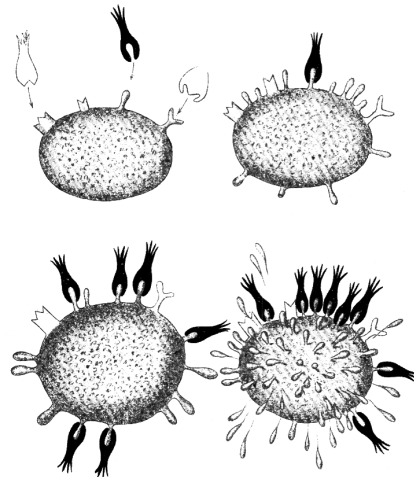


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Seitenkettentheorie von Paul Ehrlich⁹

1.1.2 Antikörperklassen und Antikörperaufbau

Antikörper sind eine Klasse von Glykoproteinen, welche aus unterschiedlichen Domänen aufgebaut sind. Die Domänen unterscheiden sich in Struktur und Funktion. Humane Antikörper sind in verschiedene Klassen aufgeteilt, die sich jedoch alle in einer Y-förmigen Heterodimerstruktur ähneln. Der Aufbau jeder dieser Strukturen besteht aus einem Paar identischer schwerer Ketten (~50-75 kDa) und einem Paar leichter Ketten (~25 kDa). Die Antikörperklassen sind auf ihrer zu Grunde liegenden der schweren Kette definiert. Die schweren Ketten α , δ , ϵ , γ und μ definieren die Klassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, die alle unterschiedliche Funktionen im Immunsystem haben. Die Isoformen der leichten Kette (entweder κ oder λ) sind für alle Antikörperklassen identisch. Tabelle 1-1 gibt eine Übersicht der unterschiedlichen Klassen und deren Isoformen¹².

Tabelle 1-1: Übersicht der unterschiedlichen Antikörperklassen und deren Isoformen

Klasse	Schwere Kette	Subklassen	Leichte Kette
IgG	γ	$\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$	κ oder λ
IgM	μ	Keine	κ oder λ
IgA	α	$\alpha 1$, $\alpha 2$	κ oder λ
IgE	ϵ	Keine	κ oder λ
IgD	δ	Keine	κ oder λ

Die Grundstruktur der unterschiedlichen Antikörperklassen am Beispiel eines IgGs (Abbildung 2) besteht aus einem Fc-Teil („fragment crystallizable“) und dem Antigen-bindenden Fab-Fragment („fragment antigen binding“). Trotz ihrer unterschiedlichen Funktionen bestehen beide Untereinheiten in erster Linie aus β -Faltblättern. Der Fc-Teil eines IgG Antikörpers ist unterteilt in eine Gelenkregion, die C_H2- und die C_H3-Domäne. Die Funktionen dieses Teils sind zum einen die Interaktion mit Effektorzellen des Immunsystems und zum anderen die Verlängerung der Halbwertszeit im Serum¹³⁻¹⁶. Das Fab-Fragment bindet mit einer spezifischen Affinität an sein jeweiliges Antigen bindet, enthält Elemente aus

leichter und schwerer Kette. Die C_H1 - bildet zusammen mit der V_H -Domäne den Teil der schweren Kette, während C_L (aus Kappa (κ) oder lambda (λ)) und V_L die leichte Kette bilden. Die größte Gruppe der Immunglobuline bilden die IgG¹⁷. Diese Gruppe ist weiter in die Subklassen IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ unterteilt. Die unterschiedlichen Subklassen haben 95 % Strukturhomologität. Die größten Aminosäureunterschiede sind in der *Hinge* Region. Zudem gibt es Abweichungen in dem Bereich der Disulfidbrücken zwischen leichter und schwerer Kette. Hier ist das für die Brückenbildung verantwortliche Cystein unterschiedlich platziert¹⁸⁻²¹. Die Isoformen sind sich jedoch aufgrund der nur geringen Abweichungen in der Aminosäuresequenz in ihrer dreidimensionalen Struktur sehr ähnlich¹².

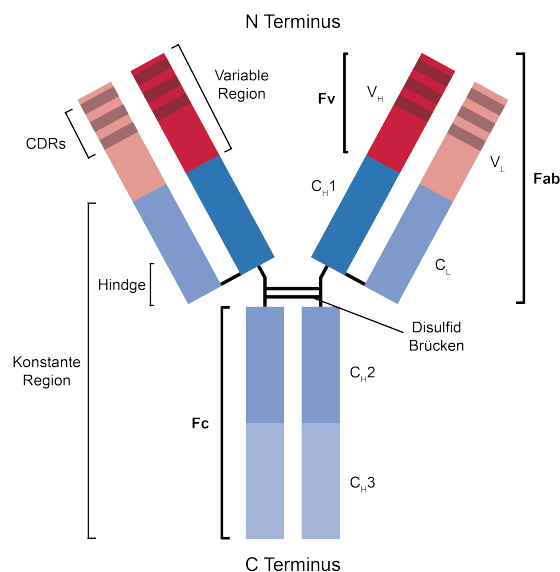


Abbildung 2: Detaillierte Darstellung des Immunglobulin G

V_H und V_L bilden einen nicht-kovalenten Komplex und bilden so die *Fragment variable* (F_V)-Region. Ein Teilbereich der F_V -Region, der Kontakt zum Antigen hat, sind die *complementarity determining regions* (CDR). Diese bilden drei hypervariable Loops genannt CDR-L1, CDR-L2 und CDR-L3 für die leichte Kette und CDR-H1, CDR-H2 und CDR-H3 für die schwere Kette. Über Kristallstrukturanalysen konnten dafür die exakten Proteinloci definiert werden²². Zwischen den CDR befinden sich sowohl für die leichte Kette als auch für die schwere Kette die sogenannten Framework-Regionen. Die genaue Definition der CDR hat sich im Laufe der Jahre verändert, sodass es je nach Analyseverfahren zu Unterschieden in der genauen Bestimmung kommen kann²³⁻²⁸. CDR der V_H und V_L unterscheiden sich in der Länge der Aminosäuresequenzen. In Tabelle 1-2 sind die Längen dargestellt.

Tabelle 1-2: Länge der Aminosäuresequenz der CDR von V_L und V_H nach Chothia²⁹

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
Schwere Kette	8-10	6-8	3-25
	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
Leichte Kette	10-17	7	(3) 7-11

1.1.3 Organisation und Expression von Immunglobulingenen

Das humane B-Zell System exprimiert $\sim 10^8$ verschiedene Antikörper, wobei jede B-Zelle $\sim 10^5$ Kopien jedes Antikörpers produziert. Jeder Antikörper setzt sich aus einer schweren und einer leichten Kette zusammen. Bei den leichten Ketten wird zwischen Lambda und Kappa unterschieden. Die Gene sind auf den Chromosomen 22 (leichte Kette - Lambda), Chromosom 2 (leichte Kette – Kappa) und Chromosom 14 (schwere Kette) kodiert (Abbildung 3)³⁰⁻³².

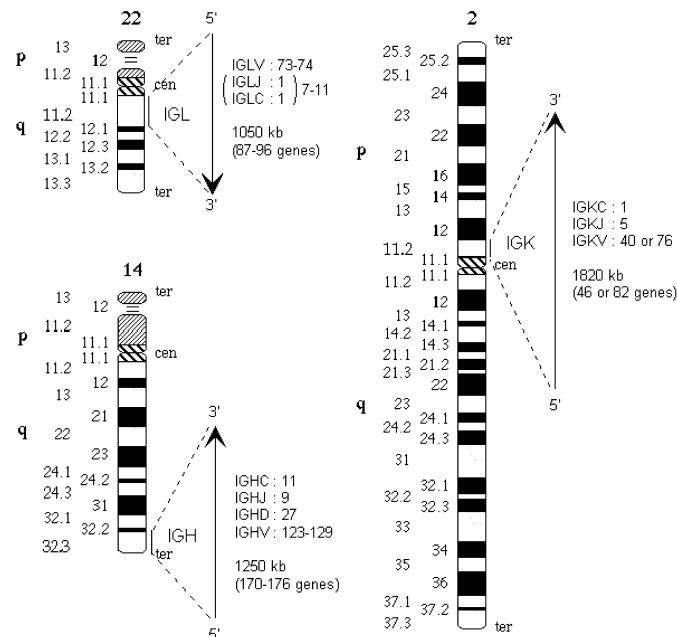


Abbildung 3: Lokalisation der humanen Immunglobulingene³⁰⁻³²

Verglichen mit dem Ein-Gen-ein-Protein-Dogma sind die Diversität und der Aufbau der Antikörper ein Paradoxon. Die schweren und leichten Ketten haben C-terminal variable Regionen, denen N-terminal eine konstante Region folgt. Darüber hinaus sind bei der schweren Kette variable Regionen zu finden, denen unterschiedliche konstante Regionen folgen. Dies wird durch die somatische Theorie erklärt, die besagt, dass aufgrund von genetischen Rekombinationen wie somatischer Mutationen und Rekombination eine kleine Nummer von Keimbahngenen zu einer großen Menge von Antikörpern führt³³. Für die leichten Ketten wird das Generieren der V_L durch drei Gensegmente erreicht, von denen zwei in der fertigen Kette im Antikörper zu finden sind: *Leader*, *variable* (V-) und *joining* (J-) Segment¹⁷.

V- und J-Segment werden zunächst auf DNA-Ebene kombiniert und anschließend in RNA transkribiert, die nach Polyadenylierung und Spleißen im Anschluss translatiert wird. Nach dem Transport durch das ER wird das *Leader*-Peptid entfernt¹⁷.

Die schwere Kette besteht aus vier Elementen: *Leader*, V-, D- und J-Segment. Der Zusammenbau verläuft entsprechend der leichten Kette, wobei zunächst die Elemente D und J verbunden werden und das V-Segment folgt. Je nach Antikörper-Subtyp sind

unterschiedliche *constant* (C-) Segmente zu finden¹⁷. In Abbildung 4 ist dieser Vorgang schematisch dargestellt.

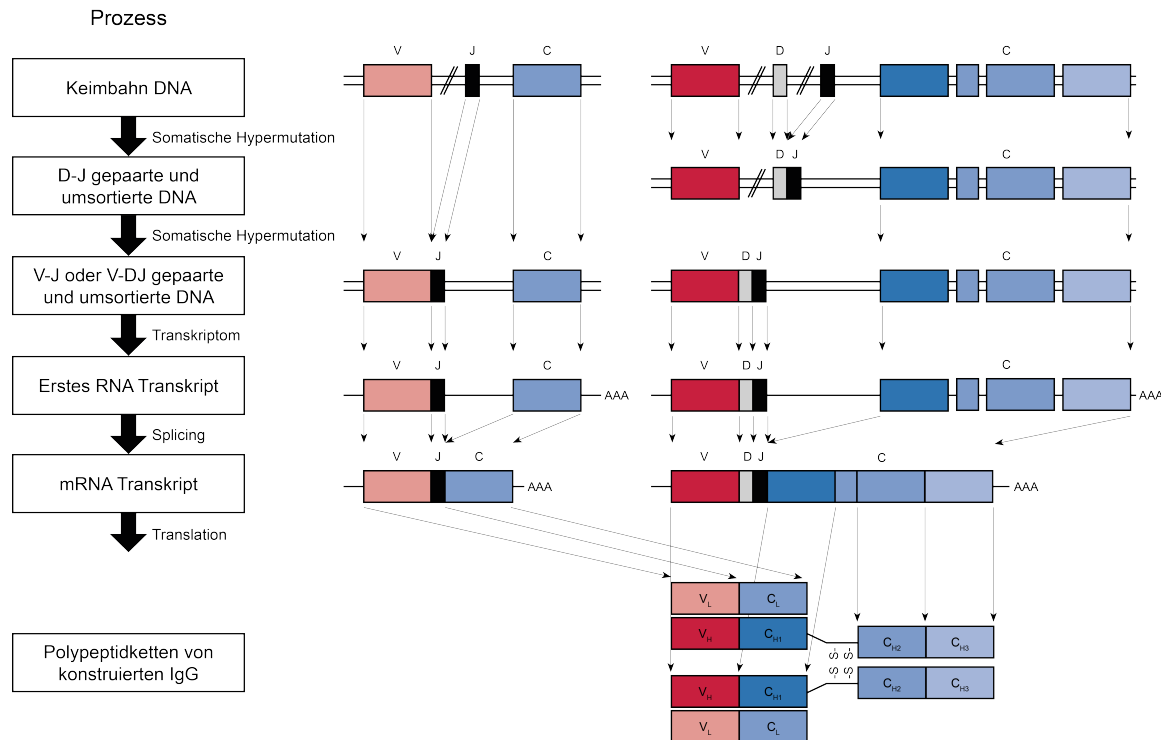


Abbildung 4: Organisation und Rearrangement von Keimbahngenen¹⁷

Die Kombinationen aus einer großen Zahl an unterschiedlichen V-, (D-) und J-Segmenten der schweren und leichten Kette führen zu einer theoretischen Diversität von $\sim 3 \times 10^6$ unterschiedlichen Antikörpern (Tabelle 1-3).

Tabelle 1-3: Geschätzte Anzahl an Keimbahnsegmenten (verändert nach¹⁷)

Keimbahn Segmente	Schwere Kette	Leichte Ketten	
		κ	λ
V	51	40	30
D	27	0	0
J	6	5	4
Kombinatorische V-D-J und V-J Verbindungen (Mögliche Anzahl an Kombinationen)	$51 \times 27 \times 6 = 8262$	$40 \times 5 = 200$	$30 \times 4 = 120$
Kombinatorische Möglichkeiten durch Zusammenbringen der V _L und V _H	$8262 \times (200 \times 120) = 2,64 \times 10^6$		

Die postulierte theoretische Diversität von 10^{10} - 10^{11} wird im Weiteren durch Reorganisation von bestimmten DNA-Abschnitten (RSS) erreicht.¹⁷

1.1.4 Antikörperformate

Die modular aufgebaute Domänenstruktur von Immunglobulinen wurde dazu verwendet eine immer größer werdende Anzahl an künstlichen, alternativen Antikörperformaten zu generieren. Sie unterscheiden sich in Molekulargewicht und Valenz. Rekombinante Formate auf Basis des IgGs mit bis zu fünf Bindungsstellen sind beschrieben³⁴⁻³⁶. Darüber hinaus

lassen sich diese Formate über Linker zu Diabodies (n=2), Tribodies (n=3), Tetrabodies (n=4) oder noch größeren Konstrukten verknüpfen³⁷.

Häufig bildet das single chain variable (V)-domain Fragment (scFv) die Grundlage neuer Antikörperformate. Das scFv Fragment besteht aus den V-Domänen der schweren und leichten Kette, die durch einen ca. 15 Aminosäuren langen Peptidlinker verknüpft sind.

Rekombinante Antikörperfragmente werden bei der *in vitro* Selektion eingesetzt und haben den Vorteil sich besser bakteriell exprimieren zu lassen als vollständige Antikörper (z.B. IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, IgY etc.). Des Weiteren besitzen einige Formate verbesserte thermale Stabilität, Stabilität gegenüber Proteasen und binden Epitope, die für herkömmliche Antikörperformate nicht zugänglich sind. In Abbildung 5 sind einige beschriebene Antikörperformate dargestellt.

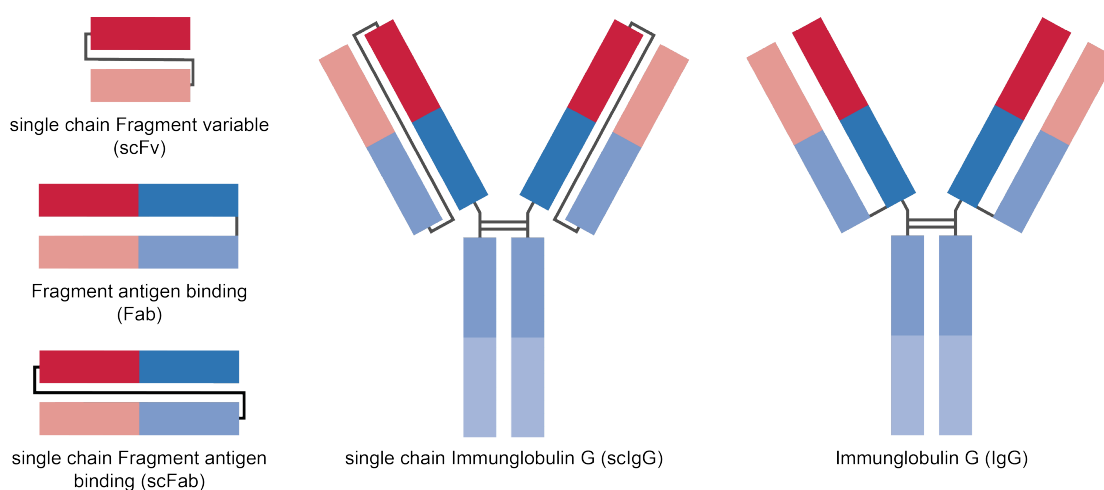


Abbildung 5: Schematische Darstellung verschiedener Antikörperfragmente und Fusionsproteine

1.1.5 Konvertierung von Antikörpern

Bis heute wurden 46 monoklonale Antikörper durch die FDA zugelassen (Tabelle 1-4), 33 befinden sich in Phase 3 der klinischen Studien, weitaus mehr in Phase 1 und 2³⁸⁻⁴⁰.

Tabelle 1-4: Durch die FDA zugelassene Antikörper (Stand August 2014)⁴⁰

INN	Marktnamen	Spezies	Spezifität
abatacept	Orencia	Human	CD80 & CD86
abciximab	Reopro	Chimäre	ITGA2B_ITGB3
adalimumab	Humira	Human	TNF 2
aflibercept	Zaltrap	Human	VEGFA
alefacept	Amevive	Human	CD2
alemtuzumab	Campath	Humanisiert	CD52
basiliximab	Simulect	Chimäre	IL2RA
belimumab	Benlysta	Human	TNFSF13B
bevacizumab	Avastin	Humanisiert	VEGFA
brentuximab vedotin	Adcetris	Chimäre	TNFRSF8
canakinumab	Ilaris	Human	IL1B
catumaxomab	Removab	Mus musculus	CD3E
certolizumab pegol	Cimzia	Humanisiert	TNF
cetuximab	Erbix	Chimäre	EGFR
denosumab	Xgeva	Human	TNFSF11
eculizumab	Soliris	Humanisiert	C5

INN	Marktnamen	Spezies	Spezifität
edrecolomab	Panorex	Mus musculus	EPCAM
etanercept	Enbrel	Human	TNF
golimumab	Simponi	Human	TNF
ibritumomab tiuxetan	Zevalin	Mus musculus	MS4A1
infiximab	Remicade	Chimäre	TNF
ipilimumab	Yervoy	Human	CTLA4
mogamulizumab	Poteligeo	Humanisiert	CCR4
muromonab-CD3	Orthoclone okt3	Mus musculus	CD3E
natalizumab	Tysabri	Humanisiert	ITGA4
nimotuzumab	Theracim	Humanisiert	EGFR
ofatumumab	Arzerra	Human	MS4A1
omalizumab	Xolair	Humanisiert	IgE Fc
palivizumab	Synagis	Humanisiert	glycoprotein F RSV
panitumumab	Vectibix	Human	EGFR
pertuzumab	Perjeta	Humanisiert	ERBB2
ranibizumab	Lucentis	Humanisiert	VEGFA
raxibacumab	Abthrax	Human	Anthrax protektives Antigen
rilonacept	Arcalyst	Human	IL1A
rituximab	Rituxan	Chimäre	MS4A1
romiplostim	Nplate	Human	MPL
tocilizumab	Actemra	Humanisiert	IL6R
tositumomab	Bexxar	Mus musculus	MS4A1
trastuzumab	Herceptin	Humanisiert	ERBB2
trastuzumab emtansine	Kadcyla	Humanisiert	ERBB2
ustekinumab	Stelara	Human	IL12B

Mit einem Anteil von 20 % aller Biopharmazeutika machen monoklonale Antikörper die zweitgrößte Produktkategorie in den klinischen Studien aus. Einige der Antikörper wurden durch frühe Antikörpertechnologien generiert und sind chimäre oder humanisierte Antikörper. Heute werden vermehrt humane Antikörper generiert, die aus humanen Phagen-Display Bibliotheken oder transgenen Mäusen stammen ⁴¹⁻⁴⁴.

Durch Maus-Hybridom-Technologie generierte monoklonale Antikörper können dank Gentechnik zu chimären oder humanisierten Antikörpern verändert werden. Zur Erstellung chimärer Antikörper werden die variablen Regionen der Maus in die konstanten Frameworkgene humaner Antikörpersequenzen kloniert. Die Generierung humanisierter Antikörper erfolgt hingegen durch das Klonieren der Maus-CDR in die variable Region menschlicher Antikörpergene. Gegebenenfalls auftretende veränderte Bindungseigenschaften können durch Rückmutationen im Framework verhindert werden ^{45,46}.

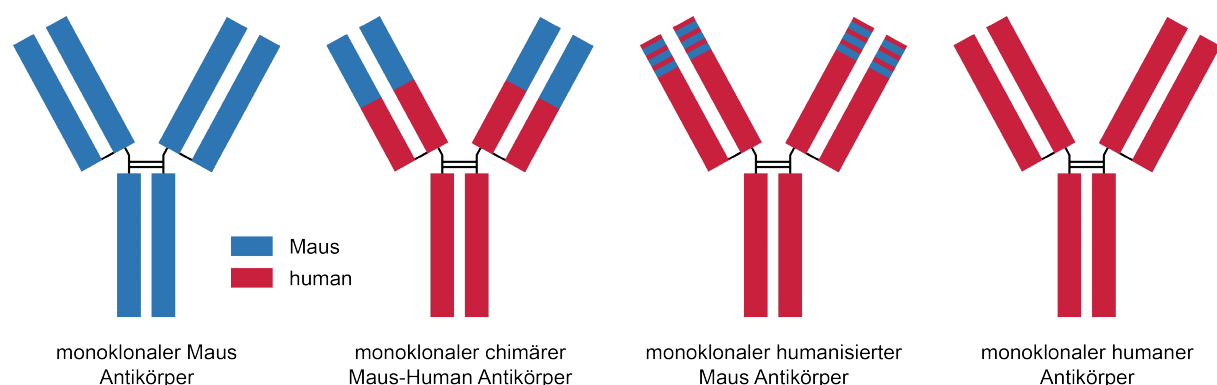


Abbildung 6: Schematische Darstellung fortschreitender Humanisierung eines monoklonalen Maus Antikörpers

Es konnte gezeigt werden, dass chimäre, humanisierte und humane Antikörper im Menschen weniger immunogen sind als Mausantikörper⁴⁷. Humanisierte Antikörper enthalten weniger fremde Sequenzen als der entsprechende chimäre Antikörper und gelten folglich als weniger immunogen. Gleiche Rückschlüsse wurden für humane und humanisierte Antikörper gezogen, welche bisher jedoch nur teilweise durch klinische Daten bestätigt werden konnten^{47,48}. In Abbildung 6 sind die verschiedenen Formen schematisch dargestellt.

1.1.6 Antikörpergenerierung

Die Herstellung von Antikörpern wird durch eine Vielzahl von Methoden ermöglicht. Eine der wichtigsten Technologien zur Herstellung rekombinanter Antikörper ist die Hybridom-Technologie. Systeme, welche die Expression von rekombinanten Antikörpern, die Selektion von besser affinen sowie das Display von ganzen Antikörperbibliotheken ermöglichten, brachten weitere wichtige Fortschritte in der Antikörperselektion.

Phage Display ist die heute am häufigsten verbreitete Methode zur Selektion von monoklonalen Antikörpern. Darüber hinaus werden transgene Mäuse mit humanem Ig Locus verwendet. Die Immunisierung einer solchen Maus führt einerseits zur Antikörperantwort im Organismus, andererseits ermöglicht diese, dass aus isolierten B Zellen Hybridome generiert werden können. In Abbildung 7 ist der zeitliche Ablauf der wichtigsten Meilensteine zur Generierung rekombinanter therapeutischer Antikörper dargestellt¹².

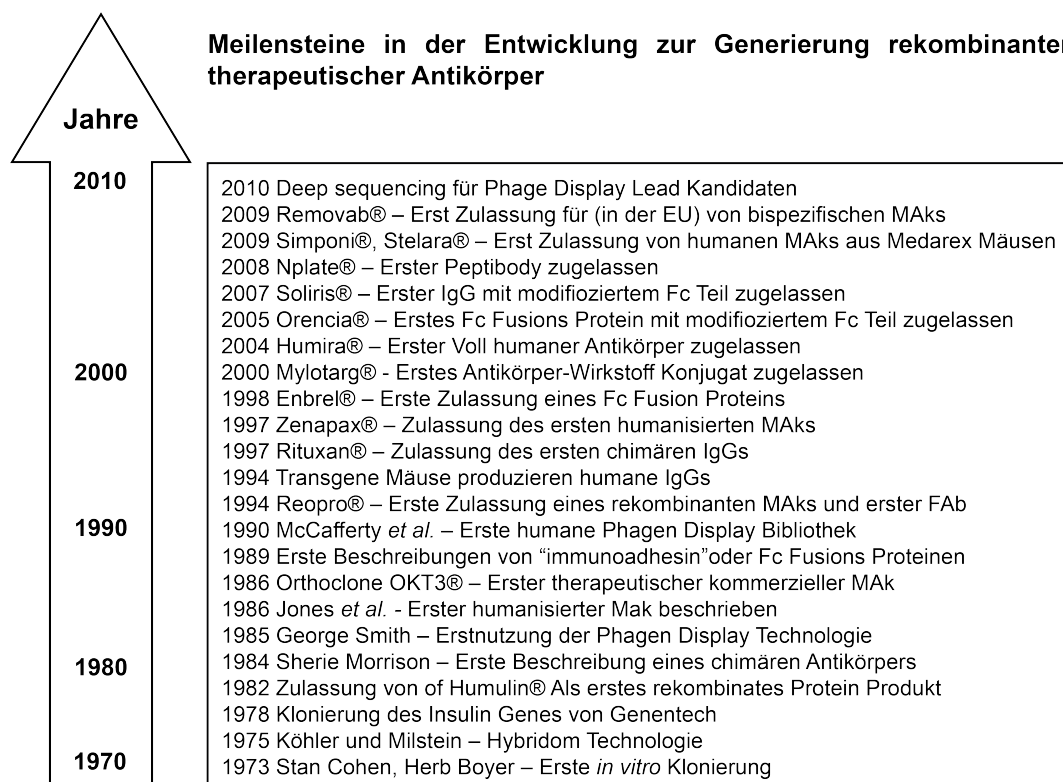


Abbildung 7: Ereignisse von 1973 bis 2010, die zur Generierung monoklonaler Antikörper und Fc-Fusionsproteinen führten (verändert nach¹²).

1.1.6.1 Polyklonale Seren

Durch eine Immunreaktion gegen ein Antigen können Polyklonale Seren (Gemisch aus Antikörpern) von B-Lymphozyten oder Plasmazellen gebildet werden. Zur Herstellung wird das Antigen verabreicht, wodurch es zur Immunreaktion kommt. Hier werden zunächst IgMs, später IgGs produziert. Die Affinität der Seren gegenüber dem verabreichten Antigen erhöht sich im Laufe der Zeit. Bei der Immunisierung unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Immunantwort (Abbildung 8).

Häufig werden Antikörperseren in Kaninchen, Pferd, Schaf, Schwein und Meerschweinchen produziert.

Antikörperseren haben den Nachteil, durch das fehlen eines klar definierten Epitops, nur wenig definiert zu sein. Das erzeugte Antikörpergemisch kann bei Anwendung zu ungewünschten Kreuzreaktionen führen^{17,49}.

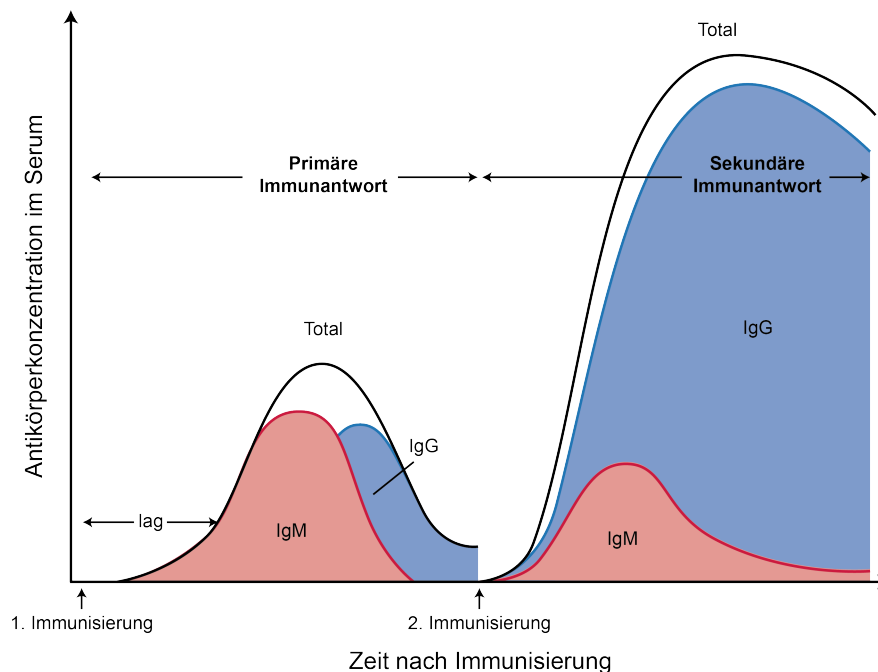


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Immunantwort über die Zeit. Dargestellt ist die IgM und die IgG Konzentration (verändert nach¹⁷).

1.1.6.2 Monoklonale Seren

Für die Herstellung monoklonaler Antikörper werden verschiedene Techniken eingesetzt. Etabliert ist hier die bereits genannte Hybridom-Technologie sowie verschiedene Display Methoden auf Basis von Ribosomen, Hefen oder Phagen⁵⁰.

1.1.6.2.1 Hybridom Technologie

Die Entwicklung der Hybridom Technologie wurde erstmals 1975 von Milstein und Köhler beschrieben und gilt als wegweisend für die heutige Generierung monoklonaler Antikörper⁵¹. Zur Generierung eines Hybridomklons werden Antikörper produzierende B-Zellen mit

unsterblichen Zellen, wie zum Beispiel Myelomzellen, fusioniert und dienen im Folgenden als stabile Quelle für Antikörper mit definierter Spezifität und Affinität^{51,52}

Die Generierung von Antikörpern mittels Hybridom-Technologie beginnt mit der Immunisierung von Nagern. Um die Immunantwort zu erhöhen, werden Antigene mit Adjuvantien versetzt⁵³. Sobald der entsprechende Antikörpertiter im Blut erreicht ist, wird die Milz entfernt und Antikörper produzierende B Zellen isoliert. Diese werden mit immortalen Maus- und Ratten-Myelomzellen wie z.B. SP2/0, NS0, F0 oder Y/0 fusioniert⁵³⁻⁵⁶. Durch die anschließende Kultivierung der Hybridom-Klonen in HAT Medium werden fusionierte Zellen selektiert (Abbildung 9). Durch Vereinzeln können Antikörper produzierende Klone kultiviert werden und bei Bedarf kloniert werden, um so rekombinant Antikörper produzieren zu können. Verschiedenste Optimierungen führten dazu, dass die Hybridom-Technologie robuster und weniger zeitaufwendig ist und daher auch heute noch eine wichtige Plattform zur Generierung von monoklonalen Antikörpern darstellt^{53,57,58}.

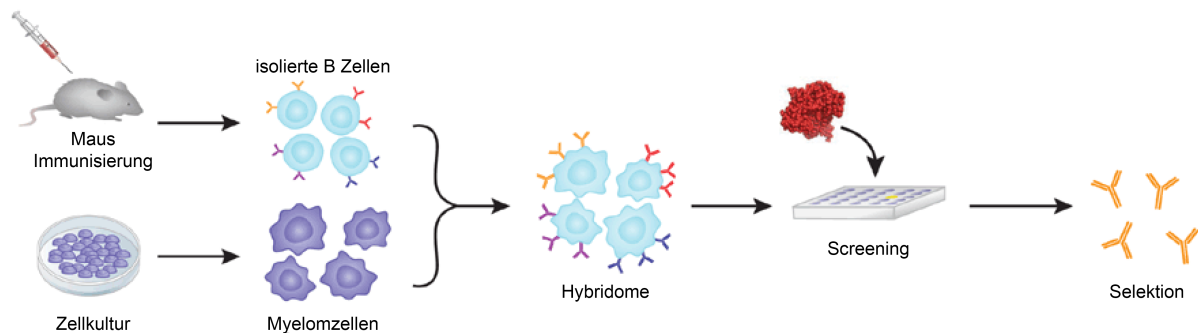


Abbildung 9: Schematische Darstellung zur Generierung von Hybridomen und der Selektion von Antikörpern (verändert nach⁵⁹).

1.1.6.2.2 Display Technologien

Die Grundlage der heute angewandten Display-Technologien wurde 1985 von George Smith geschaffen. Dieser fusionierte erfolgreich ein Peptid an das pIII Protein der filamentösen Phage M13 und führte Selektionen durch⁶⁰.

Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile einiger wichtiger Display-Technologien erläutert, die verwendet wurden, um Antikörper aus großen Bibliotheken zu selektieren oder Methoden genannt, die zur Optimierung bereits vorhandener Strukturen eingesetzt wurden.

Hefen Display

Das Display von Proteinen auf Hefen ist eine Möglichkeit, um z.B. Antikörperpräsentation mit der jeweils kodierenden DNA zu verbinden⁶¹. Ein Vorteil des Hefe-Displays ist es, Antikörperproduktion und Antigenbindung durch Fluoreszenz-markierung im FACS parallel zu testen⁶¹⁻⁶³. Diese Technologie erlaubt schon im Vorfeld, ohne die Notwendigkeit zur

Produktion von löslichen Antikörperfragmenten, eine Aussage über die Bindungseigenschaften zu treffen⁶⁴. Des Weiteren wird durch den eukaryotischen Sekretionsweg die Präsentation von richtig gefalteten Antikörpern favorisiert^{65,66}; es findet somit eine Selektion gegen Varianten mit falscher Faltung statt. Eine Limitierung des Hefen Displays ist die Bibliotheken-Größe. Durch vergleichsweise schlechte Transformationseffizienzen von *Saccharomyces cerevisiae* im Vergleich zu *E. coli* wurden in der Vergangenheit lediglich Library Größen von 10^7 Klone erreicht. Erst durch die Präsentation von Fab Fragmenten und der Möglichkeit auf zwei unterschiedlichen Stämmen leichte und schwere Kette getrennt zu kodieren, konnten die Bibliotheken-Größen vervielfacht werden^{67,68}.

Weitere Optimierungen durch Wittrup und Kollegen erlaubten die Generierung von scFv Mutationsbibliotheken, die Binder im sub-pM Bereich hervorbrachten^{61,62,69}. Hefen Display lässt sich also zum Einen durch die Nutzung von naiven Bibliotheken mit einer Größe von $>10^9$ zur *de novo* Generierung von Antikörper(-fragmenten) als auch zur Affinitätsmaturierung durch Mutationsbibliotheken verwenden^{63,67,68}. Mittels Hefen-Display konnten somit Antikörper mit verbesserten Affinitäten⁶⁹ und verbesserter thermischer Stabilität⁷⁰ generiert werden. Des Weiteren wurde diese Technologie zum Epitop-Mapping und zur Generierung von Antikörpern gegen neue Epitope verwendet⁷¹⁻⁷³. Durch die Erstellung eines Shuttle-Vektors gelang es Wang und Kollegen eine Plattform zu generieren, die es ermöglicht mit der gleichen Bibliothek Antikörper in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Systemen zu screenen^{74,75}.

Mammalia Zell Display

Die Generierung und Expression von Immunglobulinen mittels Mammalia Zell-Display sollte die bevorzugte Methode zur Generierung von Antikörpern sein. Limitierungen in Bezug auf die Library Größe vermindern jedoch den Einsatz dieser Technologie. Dennoch wurden sowohl naive als auch Immunbibliotheken generiert, welche die Möglichkeit hatten, ähnlich dem Screening beim Hefe Display, mittels FACS Antikörper zu selektieren^{76,77}.

Bakterien Display

Hohe Transformationsraten und die Möglichkeit funktionsfähige Antikörperfragmente bis hin zu vollständigen IgGs in Bakterien zu produzieren^{78,79}, lassen bakterielles Display als eine geeignete Methode erscheinen. Jedoch sind bisher nur wenige Beispiele bekannt, in denen erfolgreich Antikörper aus Mutationsbibliotheken maturiert oder sogar Antikörper aus naiven Bibliotheken selektiert werden konnten⁸⁰. Das größte Problem der Proteinpräsentation auf Bakterien liegt in der Sekretion von Proteinen. Hier bildet die bakterielle Zellwand das größte Hindernis. Antikörper-Bibliotheken wurden für das gram positive Bakterium *Staphylococcus*

carneus generiert⁸¹ und konnten ähnlich wie die bereits beschriebenen Technologien zur Antikörperselektion mittels FACS verwendet werden. Löfblom und Kollegen nutzen die Technologie zudem, um Antikörper nach ihrer Affinität zu klassifizieren^{81,82}.

Zahlreiche Beispiele für Antikörperbibliotheken gram negativer Bakterien sind für *E. coli* beschrieben⁷⁹. ScFv Fragmente wurden mit Teilen des Bakteriophagenproteins pIII fusioniert und so auf der Bakterienoberfläche präsentiert. Zahlreiche Antikörperfragmente wurden so mittels FACS selektiert und maturiert^{78,79}. Durch weitere Optimierungen gelang es Mazor und Kollegen komplette IgGs in *E. coli* zu exprimieren, zu präsentieren und anschließend erfolgreich zu selektieren⁸³⁻⁸⁵.

Ribosomen Display

Bei der Ribosomen-Technologie werden Antikörper selektiert, indem aus großen DNA-Bibliotheken im zellfreien System stabile Komplexe aus Antikörpern, Ribosomen und mRNA (ARM) gebildet werden^{58,86,87}. Durch das Ersetzen des Stopp Codons der mRNA verbleiben die Ribosomen nach der Transkription an der Nukleinsäure und können anschließend zur Selektion auf immobilisierten Antigenen eingesetzt werden⁸⁶. Durch RT-PCR kann die DNA der mit dem Antigen interagierenden ARM Komplexe amplifiziert werden und Einzelklone mittels *E. coli* Transformation und Produktion analysiert werden. In mehreren Selektionsrunden können so spezifische Binder isoliert werden. Der Vorteil dieser Technologie liegt insbesondere in der Möglichkeit nach jeder Selektionsrunde randomisierte oder ortsgerichtete Mutationen einzufügen, um auf diese Weise Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften zu generieren^{87,88}.

Phagendisplay

Das Phagendisplay wird verwendet, um Protein-Protein-, Protein-Peptid- und Protein-DNA-Interaktionen mit Hilfe von Bakteriophagen zu untersuchen, die das mit ihnen verbundene Protein auch im Genom kodiert haben. Bei dieser Technologie wird die genetische Information, welche für ein zu präsentierendes Protein kodiert, vor ein Phagenhüllprotein kloniert, was zu dem Display des entsprechenden Proteins führt. Große Peptid- oder Protein-Bibliotheken können so generiert werden und eine Selektion auf festgelegten Interaktionspartnern durchgeführt werden. Das Antikörperphagendisplay wird im folgenden Abschnitt 1.2 genauer betrachtet⁸⁹.

1.2 Antikörperphagendisplay

1.2.1 Biologie von Bakteriophagen

Die Bakteriophagen fd, M13 und f1 gehören zu der Gruppe der filamentösen Phagen, welche die Möglichkeit besitzen *E. coli* F+ zu infizieren. Filamentöse Phagen haben eine stäbchenähnliche Form, eine Länge von ~1000-2000 nm und einen Durchmesser von ~6-7 nm (siehe Abbildung 10A).

Filamentöse Phagen unterscheiden sich in der Spezifität einen Wirt zu infizieren. Hier kann zwischen *E. coli* infizierenden F- und N- spezifischen oder *Vibrio* infizierenden Typen unterschieden werden.⁹¹⁻⁹³

Die Gesamtlänge eines Virions hängt von der Größe des Genoms ab, das aus einer ringförmigen ssDNA besteht. Das Genom von M13 hat eine Größe von etwa 6400bp und kodiert für elf Gene, die für die Struktur und Replikation der Phagen verantwortlich sind. In Abbildung 10A ist der schematische Aufbau eines M13 Bakteriophagen dargestellt. Die Oberflächenproteine unterscheiden sich stark in ihrer Größe und Anzahl.

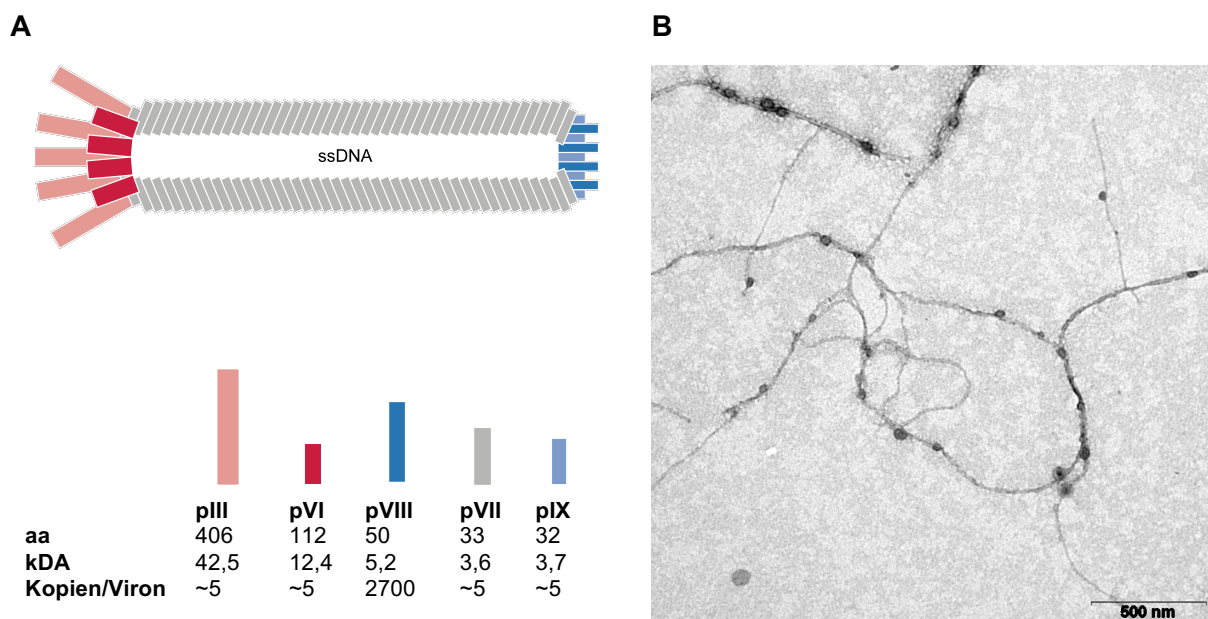


Abbildung 10: A: Schematischer Aufbau einer M13 Phage sowie Vorkommen, Größe und Molekulargewicht der Oberflächenproteine⁹⁰; B: Elektronenmikroskopische Aufnahme von M13K07 Phagen (Dr. Rhiel, Universität Oldenburg).

Die Hüllproteine umschließen das Genom, welches eine zirkuläre ssDNA darstellt. Bei der Replikation wird die ssDNA (per Definition Plusstrang) dem Bakterium injiziert und dient als Template für den Minusstrang. Die Amplifikation erfolgt hier im Wirt unter Verwendung von dessen Enzymen. Die bei der Amplifikation entstehende dsDNA wird *replicative form* (RF) genannt⁹².

Der Replikationszyklus kann in drei Hauptphasen unterteilt werden⁹⁴:

Der Phage bindet mit dem Protein III (kodiert als gIII auf dem Phagengenom) an die Spitze des F-Pilus von *E. coli*. Im Anschluss wird das original RF-Molekül in der Zelle mehrere 100 mal repliziert. Es folgt die Produktion von Phagenproteinen durch *E. coli*, die Sekretion ins Periplasma und der Zusammenbau neuer Phagenpartikel, welche dann ausgeschleust werden⁹¹.

Bei nicht lytischen Phagen wie M13 wird *E. coli* bei diesem Vorgang nicht lysiert⁹². Der schematische Ablauf einer Phageninfektion ist im Folgenden abgebildet (Abbildung 11).

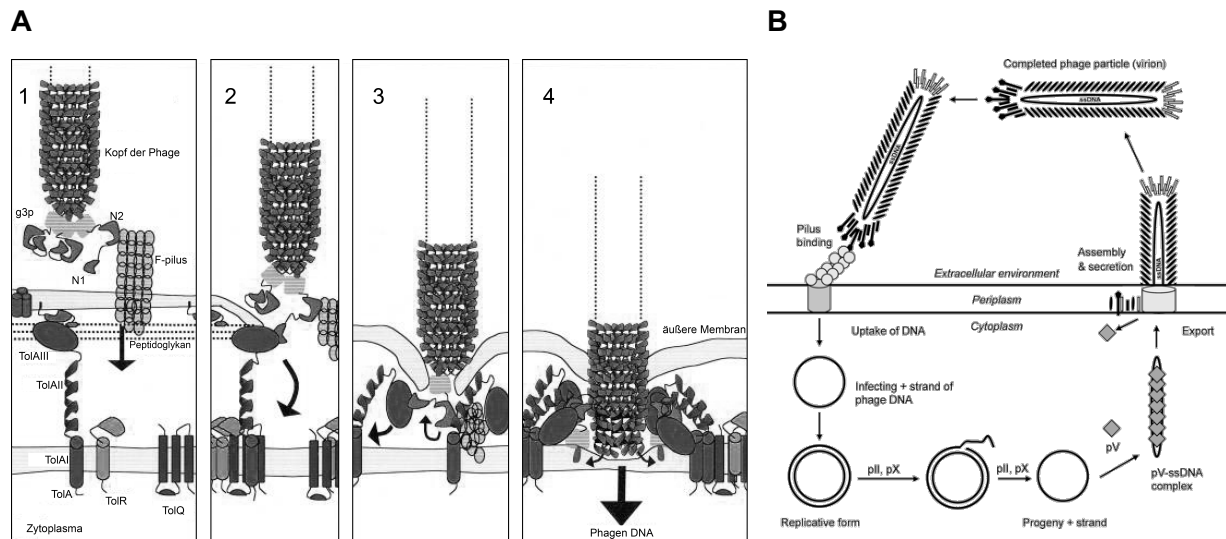


Abbildung 11: A: schematische Darstellung des Infektionsmechanismus eines Phagen (verändert nach⁹⁵); B: schematische Darstellung der Phagenproduktion von der Phageninfektion bis zur Assemblierung und der Sekretion⁹².

Infizierte Zellen sind in der Lage etwa 100 Phagenpartikel zu produzieren. Dadurch ergibt sich ein theoretischer Phagentiter von 10^{12} pfu pro mL Kulturvolumen. Bei der Infektion einer Zelle ist das gIII sowie das gVIII Protein unerlässlich. Beim gIII Protein sind es hier insbesondere die Domänen N1 und N2 sowie die ICS⁹⁵. Die für die Infektion wichtigen Bereiche des pVIII können N-terminal auf einige wenige Aminosäuren eingegrenzt werden^{96,97}.

1.2.2 Phagenvektoren

Viele der heute genutzten Phagenvektoren sind Derivate von M13 oder fd. Sie wurden in Hinblick auf Restriktionsschnittstellen und Selektionsmarker verändert und optimiert. Für gewöhnlich werden heute Antibiotikaresistenzen verwendet, um die Nutzung zu vereinfachen und infizierte Bakterien auf Grund ihrer neu erworbenen Resistenz zu selektieren. Phagenvektoren wurden in der Vergangenheit genutzt, um gesamte Bibliotheken aus Peptiden oder Proteinen auf den Oberflächenproteinen zu präsentieren. Phagen mit großen *Inserts* haben jedoch einen Nachteil im Wachstum und stehen in Konkurrenz mit schneller wachsenden Wildtypphagen. Durch das Plattieren von Phagen kann dieses Ungleichgewicht im Wachstum kompensiert werden, lässt sich aber nur schwierig für große Bibliotheken

realisieren. 1991 veröffentlichten Marks und Kollegen erstmals die Nutzung sogenannter Phagemide⁹⁸. Phagemide (~5kB) unterscheiden sich signifikant in der Größe zu herkömmlichen Phagenvektoren (~11kB) und ermöglichen so eine erhöhte Transformationseffizienz von Zellen. Zudem reduzieren sie ein Bias beim Wachstum im Vergleich zur Wildtypphage. Ein weiter Vorteil ist die Möglichkeit der einfachen genetischen Veränderung sowie die Etkopplung der Replikation von der Produktion⁹⁹.

Phagemide enthalten die *intergenic region* (IR) der filamentösen Phagen, die wiederum die ORIs des +/- Stranges und alle anderen für die ssDNA Synthese verantwortlichen Segmente enthalten. Des Weiteren enthalten sie ein nicht Phagen ORI und eine Antibiotikaresistenz, um im Bakterium Phagen unabhängig repliziert werden zu können. Zur vollständigen Phagenverpackung ist es nötig ein bereits Phagemid tragendes Bakterium mit einem Helferphagen zu infizieren, was dazu führt, dass funktionsfähige Virione sekretiert werden. Ist auf dem Phagemiden zudem ein gIII oder gVIII Fusionsprotein kodiert, werden nach erfolgreicher Infektion mit dem Helferphagen Fusionsprotein tragende Phagen produziert⁹⁹.

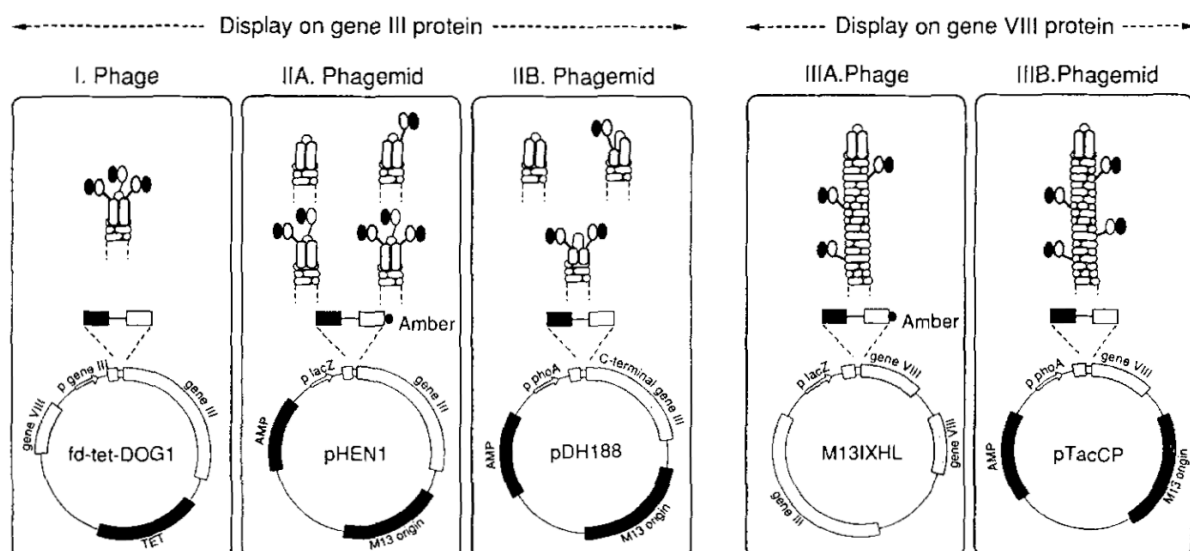


Abbildung 12: Das Display von Antikörpern auf dem pIII oder dem pVIII von Phagen oder Phagemiden⁹⁹ (Vektoren: ¹⁰⁰⁻¹⁰⁴).

1.2.3 Antikörpergenbibliotheken

1.2.3.1 Vektordesign

Eine Vielzahl von unterschiedlichen Phagen-Display-Vektoren sind beschrieben (Tabelle 1-5) welche teilweise zur Generierung von Antikörpergenbibliotheken verwendet wurden.

Tabelle 1-5: Beschriebene Phagen-Display-Vektoren sowie Eigenschaften des pIII und das verwendete Antikörperformat¹⁰⁵

Vektor	Antikörper Fragment	pIII	Quelle
pAALFab	Fab	trunkiert	106
pAALFv	Fv	trunkiert	
pAALSC	scFv	trunkiert	
pAK100	scFv	trunkiert	107
pAPIII6 scFv	scFv	trunkiert	108
pC3C	Fab	trunkiert	109
pCANTAB3his	scFv	full	110
pCANTAB5his/ pCANTAB 6	scFv	full	
pCANTAB5E	scFv	full	111
pCES1	Fab	full	112
pCM	Fab	full	113
pComb3	Fab	trunkiert	114
pComb3H	Fab, scFv	trunkiert	115
pComb3X	Fab, scFv	trunkiert	
pCW93/H, pCW99/L ¹	scFv	trunkiert	116
pDAN5 ¹	scFv	full	117
pDH188	Fab	trunkiert	118
pDN322	scFv	full	119
pDNEK	scFv	full	120
pEXmide3	Fab	full	121
pEXmide4	scFv	full	122
pEXmide5	scFv	full	123
pFAB4	Fab	trunkiert	124
pFAB4H	Fab	trunkiert	125
pFAB5c	Fab	trunkiert	124
pFAB5c-His	scFv	trunkiert	126
pFAB60	Fab	trunkiert	
pFAB73H	Fab	trunkiert	
pFCAH9-E8d	scFv-CL	trunkiert	127
pGP-F100	scFv	trunkiert	128
pGZ1	scFv	full	129
pHAL1-Fab	Fab	full	130
pHAL1-scFv	scFv	full	
pHAL1-scFab	scFab	full	
pHAL14	scFv	full	131
pHEN1	scFv, Fab, Fd, LC	full	101
pHEN1-VI3	scFv	full	132
pHEN2	scFv	full	133
pHENIX	scFv	full	134
pHG-1m/A27Jk1	scFv	full	135
pHh3mu-λ1	Fab bidirectional	trunkiert	136
pIG10	scFv	full	137
pIGT2 (vector)	scFv	full	138
pIGT3 (vector)	scFv	full	
pIT2	scFv	full	139
pLG18	Fab	trunkiert	140
pM834, pM827 ²	Fab	full	141
pMod1	scFv	full	142
pMorph series ³	scFv	?	143
pMID21	Fab	trunkiert	144
pR2	sdAb	full	145
pS1602 derivate	Fab	full ?	146
pSANG4	scFv	full	147
pSCCA2.1-E8d	scFv-CL	trunkiert	148
pScUAGDcp3	scFv with Ck	trunkiert	149
pSD3	scFv	trunkiert	150
pSEX	scFv	full	151
pSEX20	scFv	full	152
pSEX81	scFv	full	153
pWRIL-1	scFv	trunkiert	154

Die Vektorsysteme unterscheiden sich in ihrem Aufbau teils signifikant voneinander. Unterschiedliche Promotoren, wie der Lac-, gll-I, Tetrazyklin-, phoA- Promotor oder synthetische Promotoren sind beschrieben. Die korrekte Faltung der in *E. coli* exprimierten Antikörperfragmente wird im Periplasma ermöglicht. Für den Transport sind das pelB, gllI, phoA-, ompA-, stII- und das cat-Signalpeptid beschrieben, welche dafür erfolgreich verwendet wurden¹⁵⁵. Des Weiteren unterscheiden sich die Längen des gllI in den oben genannten Vektorsystemen. Gekürzte Varianten werden ebenso verwendet wie das gllI Voll-Längengen^{114,130,132}.

Zur Klonierung des Antikörperrepertoires in die genannten Vektoren wurden unterschiedliche Methoden etabliert. Immunbibliotheken werden in der Regel durch die Isolation von mRNA aus dem gewünschten Zelltyp, der cDNA Synthese und durch eine Zwei-Schritt-Klonierung oder Insertion durch *Assembly PCR* in das gewünschte Vektorsystem generiert¹².

Naive Bibliotheken werden durch zwei oder drei Schritt Klonierung aus vorher isoliertem Material generiert. Darüber hinaus sind Bibliotheken mit synthetischem oder teilweise synthetischem Ursprung beschrieben. Bibliotheken mit einer Diversität größer als 10^{11} wurden durch die Transformation von *E. coli*, Cre-Lox-Rekombination oder Lambda Phagen Rekombination generiert. In Tabelle 1-6 ist eine Übersicht über generierten Bibliotheken sowie deren Eigenschaften dargestellt¹².

Tabelle 1-6: Beschriebene Phagendisplay-Bibliotheken¹⁰⁵

Bibliotheken Name	Bibliotheken Typ	Ak Typ	Klonierungs-strategie	Bibliotheken Größe	Quelle
„a display vector“ (Pfizer Bibliothek)	naive	scFv	assembly PCR	3.1×10^{10}	156
fdDOG-2lox,pUC19-2lox	semi-synthetisch	Fab	PCR mit randomisierten CDR3 Primer, Cre-lox	6.5×10^{10}	133
fdTet	naive	scFv	Umklonierung einer naiven Bibliothek ¹⁵⁷	5×10^8	158
fdTet	semi-synthetisch	VH dAb	PCR mit randomisierten CDR Primer	1.6×10^9	105
fdTet	semi-synthetisch	VL dAb	PCR mit randomisierten CDR Primer	n.d. (53 Transformationen)	159
pAALFab	semi-synthetisch	Fab	PCR mit randomisierten CDR Primer, assembly PCR	2×10^8	106
pAP-III ₆ scFv	naive	scFv	assembly PCR	n.d.	108
pC3C	naive	Fab	assembly PCR	1.5×10^9	160
pCANTAB6	naive	scFv	assembly PCR	1.4×10^{10}	161
pCANTAB6	semi-synthetisch	scFv	PCR mit randomisierten CDR Primer	18 Bibliotheken 2.5×10^6 - 1.9×10^8	162
pCC ₁₆ (Ronit1 Bibliothek)	semi-synthetisch,	scFv	PCR mit randomisierten CDR Primer	3 Bibliotheken, jeweils 10^7 - 10^8	163
pCES1	naive	Fab	3 Schritt Klonierung (L chain, VH)	3.7×10^{10}	112
pComb3	semi-synthetisch	Fab	PCR mit randomisierten CDR H3 Primer	5×10^7	164
pComb3	semi-synthetisch	Fab	PCR mit randomisierten CDR H3 Primer	$>10^8$	165
pComb3x	naive	VH dAb	PCR mit randomisierten CDR 3 Primer	$\sim 10^{10}$	166
pDAN5	naive	scFv	Cre-lox	3×10^{11}	117
pDN322	semi-synthetisch	scFv	random CDR3 Primer, assembly PCR	3×10^8	167
pDN322	semi-synthetisch	scFv	random CDR3 Primer, assembly PCR	3.75×10^7	168
pDNEK (ETH2 Gold Bibliothek)	semi-synthetisch	scFv	random CDR3 Primer, assembly PCR	5×10^8	120
pEXmide5	semi-synthetisch	scFv	assembly PCR, CDR shuffling	9×10^6	121
pFAB5c-His (n-CoDeR Bibliothek)	semi-synthetisch	scFv	assembly PCR, CDR shuffling	2×10^9	169
pHAL14 (HAL4)	naive, kappa	scFv	2 Schritt Klonierung	2.2×10^9	130
pHAL14 (HAL7)	naive, lambda	scFv	2 Schritt Klonierung	2.8×10^9	
pHAL14 (HAL8)	naive, kappa	scFv	2 Schritt Klonierung	2.4×10^9	
pHEN1	naive	scFv	assembly PCR	10^7 - 10^8	170
pHEN1	naive	scFv	assembly PCR	2×10^5 / 2×10^6	171
pHEN1	naive	scFv	assembly PCR	6.7×10^9	157
pHEN1 (PHILO)	semi-synthetisch	scFv	assembly PCR mit randomisierten CDR3 Primer	3.1×10^9	148
pHEN1-V λ 3	semi-synthetisch	scFv	PCR mit randomisierten CDR H3 Primer	10^7	132
pHEN1-V λ 3			PCR mit randomisierten CDR H3 Primer	$>10^8$	172
pHEN1-V κ 3	semi-synthetisch (VH)/ naive (VL)	scFv	3 Schritt Klonierung, PCR mit randomisierten CDR H3 Primer	3.6×10^8	173
pHEN2 (Griffin 1. Bibliothek)	semi-synthetisch	scFv	Umklonierung von lox Bibliothek ins scFv Format ¹³³	1.2×10^9	105
pIT2 (Tom I/ J Bibliothek)	semi-synthetisch (3x VH und 4x V κ V-genes)	scFv	PCR mit randomisierten CDR2 und CDR3 Primer	1.47×10^8 / 1.37×10^8	139
pLG18	semi-synthetisch	Fab	PCR mit randomisierten CDR Primer, 2 Schritt Klonierung	$2-3 \times 10^8$	140
pMod1	naive	scFv	assembly PCR	1.5×10^8	142

Bibliotheken Name	Bibliotheken Typ	Ak Typ	Klonierungs-strategie	Bibliotheken Größe	Quelle
pMID21	synthetisches & naives	Fab	4 Schritt Klonierung mit Integration naiver CDRH3 in synthetischer HC	3.5x10 ¹⁰	144
pMorph series (HuCAL GOLD)	synthetisch	scFv	2 Schritt Klonierung, CDR3 Austausch	2x10 ⁹	143
pMorph series (HuCAL GOLD Bibliothek)	synthetisch	Fab	2 Schritt Klonierung, Austausch aller CDR	1.6x10 ¹⁰	174
pMorph series? (Ylanthia)	synthetisch	Fab	2 Schritt Klonierung?, Austausch aller CDR	1,3x10 ¹¹	
pMID21	synthetisches & naives	Fab	ONCL, 4 Schritt Klonierung mit Integration naiver CDRH3 in synthetischer HC	1x10 ¹⁰	144
pR2 (Dab Bibliothek)	semi-synthetisch	VH dAb	assembly PCR randomisierte CDR VH Primer	~3x10 ⁹	175
PS1602 Derivat (Binary code Bibliothek)	semi-synthetisch	Fab	„randomisierte“ CDR Primer	~10 ¹⁰	176
PSANG4 (McCafferty Bibliothek)	naive	scFv	2 Schritt Klonierung in PSANG2, nachfolgende scFv Klonierung in PSANG4	1.1x10 ¹⁰	147

Zur Generierung von Antikörpergenbibliotheken können, wie in Tabelle 1-6 beschrieben, verschiedene Vektoren verwendet werden. Der schematische Ablauf einer Bibliothekenklonierung ist im Folgenden schematisch dargestellt (Abbildung 13).

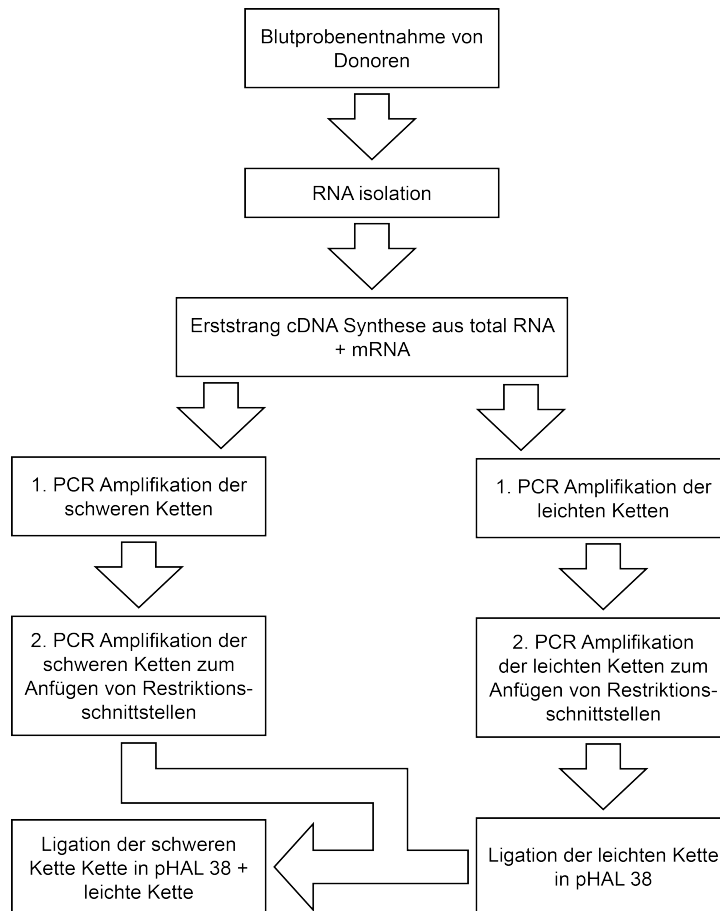


Abbildung 13: Ablauf zur Generierung einer naiven Antikörperbibliothek.

1.2.4 Selektion von Antikörperfragmenten mittels Phagendisplay

Die Selektion von Antikörperphagen durch Phagendisplay ist eine *in vitro* Methode zur Selektion von Antikörperfragmenten aus großen Bibliotheken. Während der Selektion werden Antikörper aus Bibliotheken mit einer Größe von mehr als 10^{11} verschiedenen Fragmenten isoliert und angereichert^{177,178}. Antikörperphagen werden dabei auf unterschiedliche Weise mit dem Antigen inkubiert. Immobilisierungen auf Polystyrolplatten^{164,179}, Immunröhrchen¹⁸⁰ oder Beads¹⁸¹ sowie Antigene in Lösung sind hier möglich¹⁸². Die Inkubation durch BSA oder Milchpulver dient zur Präadsorption unspezifischer oder „klebriger“ Phagen. Darüber hinaus können je nach Antikörperanforderung weitere Peptide oder Proteine hinzugefügt werden, um zu kompetitieren oder präadsorbieren. Nicht- oder schwach gebundene Phagen werden gewaschen, Binder enzymatisch durch Trypsin, durch Veränderung der Salzkonzentration oder des pH Wertes eluiert. Eluierte Phagenpartikel werden genutzt, um

E. coli (F') zu infizieren und durch die Hyperinfektion eines Helferphagen (z.B. M13K07 oder Hyperphage) neue Phagenpartikel zu generieren. Diese Phagen werden für weitere Selektionsrunden eingesetzt (2 – 5 Selektionsrunden). Nach den Selektionsrunden werden lösliche Antikörperfragmente von Einzelklonen produziert und die spezifische Bindung am Antigen durch einen ELISA überprüft. Mittels Antikörper-Phagendisplay-Technologie lassen sich so in kurzer Zeit eine große Anzahl an monoklonalen Antikörpern generieren¹³⁰. In Abbildung 14 ist der schematische Ablauf einer Panning-runde dargestellt.

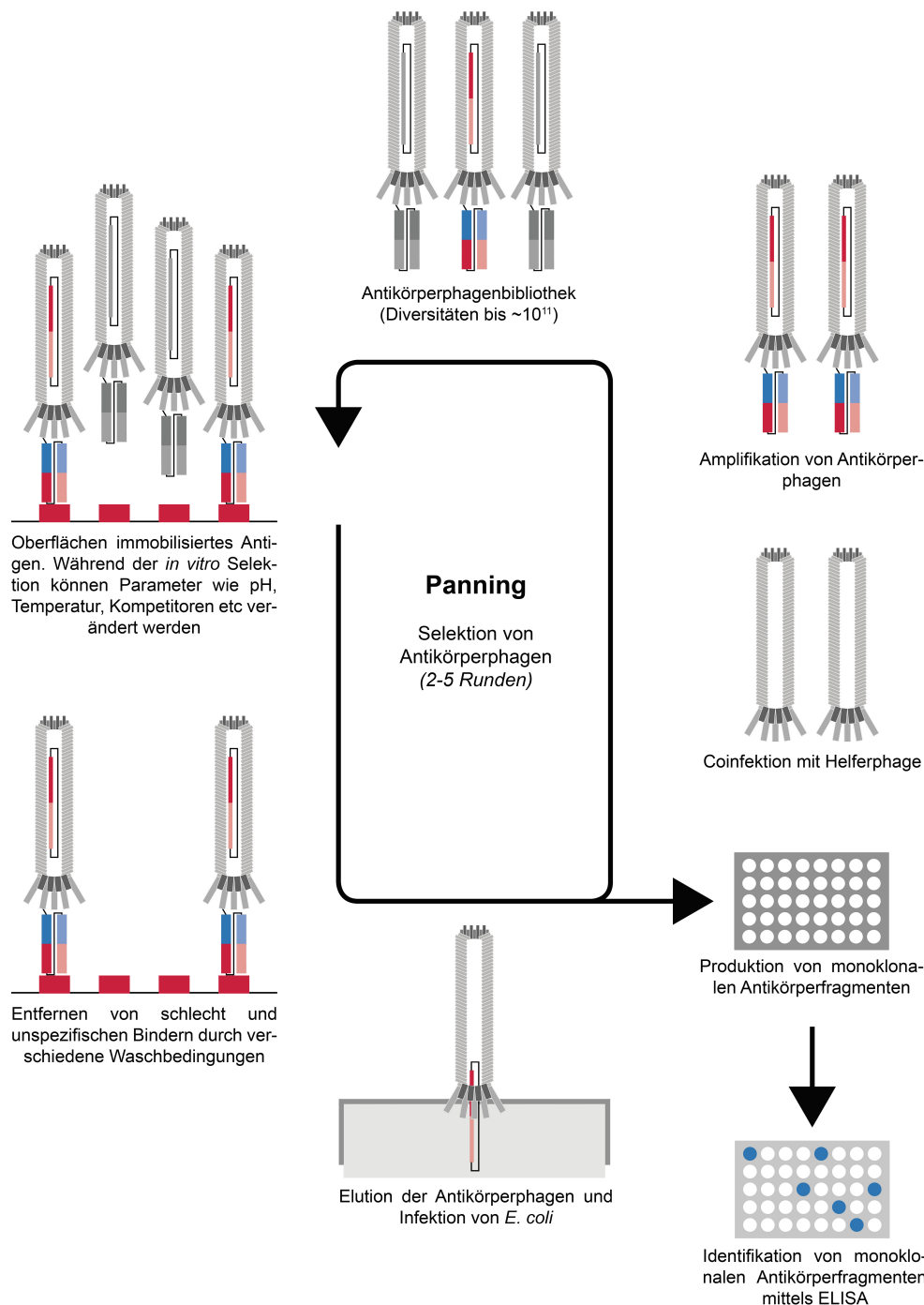


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Pannings (der Selektion von Antikörperphagen mittels Phagendisplay-Technologie) (verändert nach⁸⁹).

1.3 Produktionssysteme für Antikörper

Zur Produktion von Voll-Längen-IgGs eignen sich auf Grund ihrer Komplexität nur wenige Produktionssysteme. Durch den Gebrauch von Antikörperfragmenten konnte dieser Umstand teilweise umgangen werden. Eine Vielzahl von unterschiedlichen Systemen wie bakterielle- (gram positive und negative), Pflanzenzell-, Säugerzell-, Pilz- und Hefeexpression ist beschrieben, aus denen funktionelle Antikörperfragmente hervorgegangen sind¹⁸³.

1.3.1 Bakterielle Expression

Das am häufigsten verwendete Produktionssystem für Antikörperfragmente ist das gram-negative Bakterium *E. coli*. Die Translokation des produzierten Fragmentes vom Zytosol in das oxidative Milieu des Periplasmas erlaubt die Produktion von funktionellen Fragmenten¹⁸⁴. Fabs, scFvs, scFabs und Voll-Längen-IgGs konnten auf diese Weise erfolgreich produziert werden^{183,185,186}.

Auch gram-positive Bakterien wie *Bacillus brevis* und *Bacillus subtilis* wurden verwendet, um Antikörperfragmente zu exprimieren^{187,188}.

1.3.2 Säugerzellexpression

Aufgrund von komplexen Faltungsprozessen, Posttrans- und Sekretions-transkriptionalen Modifikationen von exprimierten Proteinen werden 60-70 % der rekombinanten pharmazeutischen Proteine in Säugerzellkultur hergestellt. Die exprimierten Proteine unterscheiden sich hier nur wenig von denen im menschlichen Körper¹⁸³. Die zunächst geringen Produktionsraten verglichen mit bakteriellen Expressionssystemen konnten im Laufe der Jahre von ~10 pg Antikörper/Zelle auf ~90 pg Antikörper/Zelle erhöht werden¹⁸⁹.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Generierung und Charakterisierung einer Antikörpergenbibliothek auf Basis des bisher wenig untersuchten single chain Fab Formates (scFab).

Spendern sollte Blut entnommen werden und nach der Isolation der mononukleäre Zellen des peripheren Blutes die Antikörper kodierenden Sequenzen durch PCR amplifiziert werden. Durch Klonierung in einen vorliegenden scFab-Vektor, sowie der Transformation von *E. coli* und einer anschließenden Phagenverpackung sollte die Bibliothek generiert werden.

Zur Charakterisierung der Bibliothek sollte die Qualität durch die Bestimmung der Größe, der Diversität, der Voll-Längen Insert-Rate und Verteilung der Keimbahnen untersucht werden.

Des Weiteren sollte das Antikörperformat scFab biochemisch analysiert werden. Parameter wie Produktivität, Aggregation, Stabilität und Präsentation auf Phagen sollten beleuchtet werden.

Die Selektion von Antikörperphagen gegen verschiedene Antigene sollte Aufschluss über die Anwendbarkeit, sowie Vor- und Nachteile des Formats in der Antikörperselektion durch Phagendisplay geben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Chromatographieanlage	Äkta purifier	GE Healthcare, München
	Äkta prime	GE Healthcare, München
	Profinia Purification	Bio-Rad, Hercules (USA)
Blot-Apparaturen	Blot-Apparatur Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Elektrophorese-Apparaturen	Biotech. Model 40-0708/40-2314	peqlab Biotech. GmbH, München
ELISA-Apparaturen	Mini Protean III	Bio-Rad, München
	Reader Tecan SUNRISE	Tecan, Crailsheim
Filtrationseinheit	Washer Columbus pro - Basic	Tecan, Crailsheim
	Nalge	Nunc, Wiesbaden
Geldokumentation	Geldokumentation	Intas, Göttingen
Inkubatoren	BE400	Memmert Omnilab, Schwabach
	HeraCell (CO ₂ -begast)	Kendro Lab. Products, Hanau
	HT Minitron (CO ₂ -begast)	Infors AG, Bottmingen
	Schüttelschrank HT	Infors AG, Bottmingen
	Thermomixer <i>comfort / compact / 5436</i>	Eppendorf, Hamburg
	Vortemp56	Labnet, Edison
	Leitz Diavert	Leitz, Wetzlar
Lichtmikroskop	Multiscan Spectrum Reader	Thermo Electron Corp., Erlangen
Mikrotiterplatten Reader	Tecan Ultra Reader	Tecan, Crailsheim
	Thermocycler DNA-Engine	Bio-Rad, München
PCR-Gerät	CG810	Schott, Mainz
pH-Meter	Libra S11	biochrom, Berlin
Photometer	NanoDrop ND-1000	peqlab Biotech. GmbH, Erlangen
	Eppendorf Research 20-1000	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Accu-jet	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe	arium 611	Sartorius, Göttingen
Reinstwasseranlage	GS3	Kendro Lab. Products, Hanau
Rotoren	SLA-3000 Super Lite	Kendro Lab. Products, Hanau
	SS34	Kendro Lab. Products, Hanau
	Überkopfschüttler CMV 3100	Labortech. Fröbel GmbH, Lindau
	Rotierapparat RA20	Gerhardt, Königswinter
	Rotierheizblock	IKAMAG RCT, Staufen
Schüttler und Wippen	Thermoshaker PST-60HL-4	lab4you, Berlin
	Wippe GFL 3013	Omnilab Laborzentrum, Bremen
SPR-Messgerät	Biacore 2000	GE Lifescience, München
Sterilbänke	HeraSafe	Heraeus Instr., Braunschweig
	LaminAir HLB 2472	Heraeus, Braunschweig
	MSC-Advantage	Thermo Scientific, Braunschweig
	Vakuumpumpe	KNF Laboport, New Jersey
Vortexer	Vortex genie 2	Scientific Industries, New York
Waagen	1203 MP	Sartorius, Göttingen
	Analytic A 120 S	Sartorius, Göttingen
	EMB 220-1	Kern, Balingen-Frommen
	Wasserbad GFL	Laborbedarf, Braunschweig

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	Eppendorf 5810R	Eppendorf, Hamburg
	Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
	Heraeus Instruments Biofuge Pico	Kendro, Haunau
	Sorval RC5B Plus	Kendro, Haunau
	Sorval RC5 Superspeed	Kendro, Haunau
	Sorval RC6 Plus	Thermo Electron Corp., Erlangen

3.1.2 Computerprogramme und Datenbanken

Tabelle 3-2: Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Bezeichnung	Anwendung	Referenz
BIAevaluation 4.1	Auswertung der Biacore-Ergebnisse	Biacore
ImageJ 1.37	Quantifizierung von Proteinen, Bildbearbeitung	Nat. Institutes of Health
Unicorn 5.10	Auswertung Chromatographie	GE Healthcare
Lasergene 8	Klonierung und Sequenzanalysen	DNA Star
Geneious 4.8.5	Klonierung	

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3-3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, München
CM5-Chip (Biacore)	GE Healthcare, München
Combitips plus (1 mL)	Eppendorf, Hamburg
Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen 15 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dialyseschläuche MWCO 6-8 kDa, 12-14 kDa	Carl Roth, Karlsruhe
Erlenmeyerkolben (Einweg)	Corning, New York (USA)
Filter Celluloseacetat 0,2 / 0,45 / 0,8 µm	Sartorius Stedim Biotech, Melsungen
Filter Minisart 0,2 / 0,45 µm	Sartorius Stedim Biotech, Melsungen
Filter Prefilter Glasfibre	Sartorius Stedim Biotech, Melsungen
Filterpapier (3 mm)	BioRad, Hercules (USA)
Gelblotting-Papier GB 002	Schleicher-Schuell, Dassel
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kulturplatte 7 cm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Kulturplatte Zellkultur 100x20 mm	SPL Life science, Gyeonggi-Do (Korea)
Kulturplatte Zellkultur 6 well	SPL Life science, Gyeonggi-Do (Korea)
Küvetten (Einweg)	Brand, Wertheim
Mikro-Schraubröhre 2 mL PP	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte MaxiSorp 96 well	Nunc, Roskilde (DK)
Mikrotiterplatte schwarz 96 well	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Parafilm	American National Can, Chicago
PCR-Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten (Einweg, serologisch) 2 / 5 / 10 / 25 mL	Corning, New York (USA)
Pipettenspitzen (mit / ohne Filter)	Sarstedt, Nümbrecht; Greiner Bio-one, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 15 / 50 mL	Corning, New York (USA)
Probengefäße, Glas (Biacore)	Chromacol LTD, Hertfordshire (UK)
Probengefäße, PP (Biacore)	Gilson, Middleton (USA)
PS-Abdeckplatte	Greiner Bio-one, Frickenhausen
PVDF-Membran T830.1	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäß 1,5 / 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Spatel (Einweg), steril	VWR, Darmstadt

3.1.4 Kits und Säulen

Tabelle 3-4: Verwendete kommerzielle Kits und Säulen

Kit / Säule	Hersteller
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
ZR Plasmid Miniprep TM - classic	Zymo Research, Irvine (USA)

3.1.5 Enzyme und zugehörige Puffer

Tabelle 3-5: Enzyme und zugehörige Puffer

Enzym / Puffer	Hersteller
BSA analytisch	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
CIP	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes, Keilaranta
Phusion-Puffer HF 5x	Finnzymes, Keilaranta
GoTaq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
GoTaq-Puffer 10x	Promega, Mannheim
Restriktionsendonucleasen	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
Restriktions-Puffer NEB 1-4	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase-Puffer	Promega, Mannheim
SuperScript III Reverse Transkriptase	Life Technologies, Darmstadt

3.1.6 Antiseren und kommerzielle Antikörper

Tabelle 3-6: Verwendete Antiseren und kommerzielle Antikörper

Antikörper / Serum		Verdünnungen		Hersteller
		ELISA	IWB	
Maus anti-C-Myc-tag	9E10/21	1:1000	1:500	AG Dübel
Ziege anti-Human IgG (Fc-spez.), AP	109-055-098		1:5000	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Human IgG (Fc-spez.), HRP	A0170	1:80000		Sigma, St. Louis
Ziege anti-Kaninchen IgG, AP	A3687		1:20000	
Ziege anti-Maus IgG (Fc-spez.), HRP	A0168	1:50000	1:20000	
Maus anti-M13 PVIII, FITC	BM5516F	1:4000		Acris, Herford
Maus anti-M13 PIII	PSKAN3	1:1000	1:2000	MoBiTec, Göttingen
Ziege anti-Maus IgG (Fc-spez.), AP	115-055-071	1:50000	1:30000	Dianova, Hamburg

3.1.7 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Die verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad p.a. und wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Unternehmen Fermentas (St. Leon Rot), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Fluka, Riedel-de Haen) bezogen.

Tabelle 3-7: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Allgemeines PBS	NaCl	2,9 M

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Glycerin Tween 20	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	150 mM
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	50 mM
	Glycerin steril	87 % (v/v)
	Tween 20 (Fluka)	0,05 - 0,1 % (v/v)
Affinitätschromatographie (IMAC)		
Bindungspuffer pH 7,4	Na ₂ HPO ₄	20 mM
	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	0,5 M
	Imidazol	10 mM
Elutionspuffer	EDTA in PBS	100 mM
NaCl-Lösung	NaCl	5 M
Nickellösung	NiSO ₄	100 mM
Waschpuffer	Na ₂ HPO ₄	20 mM
	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	0,5 M
	Imidazol	30 mM
Affinitätschromatographie (Protein A, Profinia)		
5x Binde- / Entsalzungspuffer pH 7,0	NaCl	685 mM
	KCl	13,5 mM
	Na ₂ HPO ₄	21,5 mM
	KH ₂ HPO ₄	40,5 mM
5x Elutionspuffer pH 3,0	Natriumcitrat	500 mM
	NaCl	1 M
2x Cleaning-Lösung 1 pH 8,0	Tris	100 mM
	NaCl	2 M
4x Cleaning-Lösung 2 pH 4,5	CH ₃ COONa	400 mM
2x Lagerungslösung (Entsalzungssäule)	Benzylalkohol	4 % (v/v)
1x Lagerungslösung (Protein A Säule)	Ethanol	20 % (v/v)
Agarose-Gelelektrophorese		
Agarose	Agarose	0,7-2 % (w/v)
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	25 mM
Ladepuffer	Fermentas	6x
Laufpuffer TAE pH 8,0	Tris HCl	4 mM
	Essigsäure	2 mM
	EDTA	1 mM
Coomassie-Färbung		
Entfärbelösung	Essigsäure	10 % (v/v)
Färbelösung	Coomassie-Brilliant-Blue GLR-250	0,05 % (w/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Isopropanol	25 % (v/v)
ELISA		
Blocklösung	Milchpulver in PBST	2 % (w/v)
BSA	BSA (Serva)	-
Entwicklerlösung (TMB Reagenz)	Lösung A	95 % (v/v)
	Lösung B	5 % (v/v)
Lösung A pH 4,1	Tri-Kaliumcitrat	30 mM
	Zitronensäure	50 mM
Lösung B	TMB	1 mM
	Aceton	10 % (v/v)
	Ethanol	90 % (v/v)

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
	H ₂ O ₂	0,3 % (v/v)
PBS	PBS	1x
PBST	Tween 20 in PBS	0,1 % (v/v)
Stopplösung	H ₂ SO ₄	1 N
Waschpuffer	Tween 20 in PBS	0,05 % (v/v)
Expression und Reinigung von Proteinen		
PE-Puffer pH 8,0	EDTA	1 mM
	Saccharose	20 % (w/v)
	Tris HCl	50 mM
Größenausschlusschromatographie		
Laufpuffer	PBS	1x
Lagerungspuffer	Ethanol	20 % (v/v)
Immunfärbung (AP-konjugiert)		
BCIP-Lösung	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	1,5 % (w/v)
	Dimethylformamid	100 % (v/v)
Blocklösung	Milchpulver in PBST	2 % (w/v)
NBT-Lösung	Dimethylformamid	70 % (w/v)
	NBT	3,0 % (w/v)
Substratpuffer pH 9,5	Tris HCl	100 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
Waschpuffer	Tween 20 in PBS	0,1 % (v/v)
Oberflächenplasmonenresonanz		
EDC	EDC	0,5 M
Ethanolamin-HCl pH 8,5	Ethanolamin-HCl	1 M
Glycin-Lösung pH 2,5 - 3,0	Glycin	10 mM
NaOH-Lösung	NaOH	50 mM
Natrium-Acetat-Lösung pH 3,5 - 7,0	NaAc	10 mM
NHS	NHS	0,1 M
Puffer	PBS	1x
	Tween 20 peroxidfrei (Roth)	0,01 %
PCR		
dNTPs	dNTPs (Fermentas)	10 mM
SDS-PAGE		
Acrylamidmix	Acrylamid	30 % (w/v)
	Bisacrylamid	0,8 % (w/v)
APS-Lösung	APS	10 % (w/v)
Laemmli-Puffer (5x) mit/ohne β-Merkaptoethanol	(β-Merkaptoethanol)	15 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	SDS	10 % (w/v)
Laufpuffer mit SDS pH 8,3	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	Tris HCl	25 mM
SDS-Lösung	SDS	10 % (w/v)
Tris HCl-Lösung pH 6,8	Tris HCl	1 M
Tris HCl-Lösung pH 8,8	Tris HCl	1,5 M
Western Blot		
Laufpuffer pH 8,3	Glycin	192 mM
	Tris HCl	25 mM

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Zellkultur		
Trypanblau	PBS	1x
	Trypanblau	0,4 % (w/v)

3.1.8 Mikroorganismen und Zelllinien

Tabelle 3-8: Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien

Mikroorganismus/Zelllinie	Eigenschaften/Kultivierung	Herkunft/ Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-F' [proAB + lac^q ZDM15 TN10(tet^R)]</i>	Agilent, Santa Clara
<i>E. coli</i> TG1	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r_K⁻m_K⁻) [F' traD36 proAB lac^qΔM15]</i>	Agilent, Santa Clara
<i>E. coli</i> ER2738	[F'proA+B+ lacIq ₋ (lacZ)M15 zzf::Tn10 (tet ^r)] fhuA2 glnV ₋ (lac-proAB) thi-1 ₋ (hsdS-mcrB)5	Lucigen, Middleton
HEK293 6E	humane embryonale Nierenzell-linie, Expression von Epstein-Barr-Virus-Nukleares-Antigen1	NRC, BRI, Montreal, Canada

3.1.9 Medien und Supplemente

Tabelle 3-9: Verwendete Medien und Supplemente

Medium / Supplement	Komponente	Konzentration
2xYT Agar	Bacto-Agar in 2xYT Medium	1,5 % (w/v)
2xYT Medium (pH 7,0)	Bacto-Hefeextrakt	1,0 % (w/v)
	Bacto-Trypton	1,6 % (w/v)
	NaCl	0,05 % (w/v)
2xYT-GA Medium	2xYT-Medium	-
	Glukose	100 mM
	Ampicillin	100 mg/L
Ampicillin	Ampicillin	100 mg/mL
Glukoselösung	Glukose	2 M
F17 Medium	FreeStyle F17 Expressionsmedium (Invitrogen, Darmstadt)	-
	Fütterung: Trypton N1 (PAA, Pasching, AUS)	0,1 % (w/v)
	G418	25 µg/mL
	L-Glutamin (PAA, Pasching, AUS)	7,5 mM
	Pluronic F-68 (Applichem, Darmstadt)	0,1 % (v/v)
	IPTG	1 M
IPTG-Lösung	IPTG	1 M
	Penicillin	10.000 U/mL
Penicillin/Streptomycin	Streptomycin	10 mg/mL
	RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH)	-
RPMI 1640 Medium	FCS	8 % (v/v)
	Penicillin / Streptomycin	1 % (v/v)
	Bacto-Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
SOC Medium	Bacto-Trypton	2,0 % (w/v)
	NaCl	0,005 % (w/v)
	MgCl ₂	20 mM
	Glukose	20 mM
RNA Isolation	TRIzol LS Reagent (Life Technologies, Darmstadt)	-

3.1.10 Vektoren

Tabelle 3-10: Verwendete Vektoren

Vektorbezeichnung	Verwendung
pHAL14	scFv Phagemid-Vektor
pHAL38	scFab Phagemid-Vektor
pHAL43	scFab Phagemid-Vektor
pOPE101-XP	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor
pCSE2.5-XP	Säugerzellkultur-Expressionsvektor
pCSE2.5-hlgG1Fc	Säugerzellkultur-Expressionsvektor

3.1.11 Oligonukleotide

Tabelle 3-11: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	DNA-Sequenz (5'-3')
MH LacZ Pro f	ggc tcg tat gtt gtg tgg
MhglII_r1	cta aag ttt tgt cgt ctt tcc
MHVH1_f	cag gtb cag ctg gtg cag tct gg
MHVH1/7_f	car rts cag ctg gtr car tct gg
MHVH2_f	cag rtc acc ttg aag gag tct gg
MHVH3_f1	sar gtg cag ctg gtg gag tct gg
MHVH3_f2	gag gtg cag ctg ktg gag wcy sg
MHVH4_f1	cag gtg car ctg cag gag tct gg
MHVH4_f2	cag stg cag ctr cag sag tss gg
MHVH5_f	gar gtg cag ctg gtg cag tct gg
MHVH6_f	cag gta cag ctg cag cag tca gg
MHlgMCH1_r	agt gca tcc gcc cca acc ctt
MHVK1_f1	gac atc cag atg acc cag tct cc
MHVK1_f2	gmc atc crg wtg acc cag tct cc
MHVK2_f	gat rtt gtg atg acy cag wct cc
MHVK3_f	gaa atw gtg wtg acr cag tct cc
MHVK4_f	gac atc gtg atg acc cag tct cc
MHVK5_f	gaa acg aca ctc acg cag tct cc
MHVK6_f	gaw rtt gtg mtg acw cag tct cc
MHkappaCL_r	aag agc ttc aac agg gga gag tgt
MHVL1_f1	cag tct gtg ctg act cag cca cc
MHVL1_f2	cag tct gtg ytg acg cag ccg cc
MHVL2_f	cag tct gcc ctg act cag cct
MHVL3_f1	tcc tat gwg ctg acw cag cca cc
MHVL3_f2	tct tct gag ctg act cag gac cc
MHVL4_f1	ctg cct gtg ctg act cag ccc
MHVL4_f2	cag cyt gtg ctg act caa tcr yc
MHVL5_f	cag sct gtg ctg act cag cc
MHVL6_f	aat ttt atg ctg act cag ccc ca
MHVL7/8_f	cag rct gtg gtg acy cag gag cc
MHVL9/10_f	cag scw gkg ctg act cag cca cc
MHlambdACL_r	ca gtg gcc cct aca gaa tgt tca
MHlambdACL_r2	cag ttg ccc cta cgg aat gtt ca
MHVH1Fab-Mfel_f	gtcctcgca cag gtb caa ttg gtg cag tct gg
MHVH1/7Fab-Mfel_f	gtcctcgca car rts caa ttg gtr car tct gg
MHVH2Fab-Mfel_f	gtcctcgca cag rtc caa ttg aag gag tct gg
MHVH3Fab-Mfel_f1	gtc ctc gca sar gtg caa ttg gtg gag tct gg
MHVH3Fab-Mfel_f2	gtc ctc gca gag gtg caa ttg ktg gag wcy sg
MHVH4Fab-Mfel_f1	gtc ctc gca cag gtg caa ttg cag gag tct gg
MHVH4Fab-Mfel_f2	gtc ctc gca cag stg caa ttg cag sag tss gg
MHVH5Fab-Mfel_f	gtc ctc gca gar gtg caa ttg gtg cag tct gg
MHVH6Fab-Mfel_f	gtc ctc gca cag gta caa ttg cag cag tca gg

Oligonukleotid	DNA-Sequenz (5'-3')
MHJH1/2Fab-NheI_r	ggc acc ctg gtc acy gtc tcc tca gct agc tgc gag gac
MHJH3Fab-NheI_r	ggg acg atg gtc aca gtc tct tca gct agc tgc gag gac
MHJH4/5Fab-NheI_r	gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc tgc gag gac
MHJH6Fab-NheI_r	ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gct agc tgc gag gac
MHVK1Fab-NcoI_f1	acc gcc tcc cc atg gcc gac atc cag atg acc cag tct cc
MHVK1Fab-NcoI_f2	acc gcc tcc cc atg gcc gmc atc crg wtg acc cag tct cc
MHVK2Fab-NcoI_f	acc gcc tcc cc atg gcc gat rtt gtg atg acy cag wct cc
MHVK3Fab-NcoI_f	acc gcc tcc cc atg gcc gaa atw gtg wtg acr cag tct cc
MHVK4Fab-NcoI_f	acc gcc tcc cc atg gcc gac atc gtg atg acc cag tct cc
MHVK5Fab-NcoI_f	acc gcc tcc cc atg gcc gaa acg aca ctc acg cag tct cc
MHVK6Fab-NcoI_f	acc gcc tcc cc atg gcc gaw rtt gtg mtg acw cag tct cc
MHkappaCLscFab-Mlul_r	aag agc ttc aac agg gga gag gac gcg t gga ggc ggt
MHVL1Fab-NcoI_f1	acc gcc tcc cc atg gcc cag tct gtg ctg act cag cca cc
MHVL1Fab-NcoI_f2	acc gcc tcc cc atg gcc cag tct gtg ytg acg cag ccg cc
MHVL2Fab-NcoI_f	acc gcc tcc cc atg gcc cag tct gcc ctg act cag cct
MHVL3Fab-NcoI_f1	acc gcc tcc cc atg gcc tcc tat gwg ctg acw cag cca cc
MHVL3Fab-NcoI_f2	acc gcc tcc cc atg gcc tct tct gag ctg act cag gac cc
MHVL4Fab-NcoI_f1	acc gcc tcc cc atg gcc ctg cct gtg ctg act cag ccc
MHVL4Fab-NcoI_f2	acc gcc tcc cc atg gcc cag cyt gtg ctg act caa tcr yc
MHVL5Fab-NcoI_f	acc gcc tcc cc atg gcc cag sct gtg ctg act cag cc
MHVL6Fab-NcoI_f	acc gcc tcc cc atg gcc aat ttt atg ctg act cag ccc ca
MHVL7/8Fab-NcoI_f	acc gcc tcc cc atg gcc cag rct gtg gtg acy cag gag cc
MHVL9/10Fab-NcoI_f	acc gcc tcc cc atg gcc cag scw gkg ctg act cag cca cc
MHLambdaCLscFab-Mlul_r	ca gtg gcc cct aca gaa gac gcg t gga ggc ggt

3.1.12 Sonstiges

Tabelle 3-12: Sonstiges

Produkt	Hersteller / Quelle
DNA-Massenstandard GeneRuler™ 1kB Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Protein-Massenstandard Precision Protein ladder All Blue / Unstained	Bio-Rad, München

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeines

3.2.1.1 Sterilisation und Medien

Flüssigkeiten wurden für 20 min bei 121°C sterilisiert. Glukose und Antibiotika wurden getrennt von den Medien sterilisiert und unter sterilen Bedingungen vor Nutzung vereinigt.

3.2.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.2.1 cDNA Synthese

Zur Generierung von cDNA wurde die reverse Transkriptase SuperScript III (Life Technologies) verwendet. Die Durchführung entsprach den Angaben des Herstellers.

3.2.2.2 Isolation von mRNA aus PBMCs

Die Isolation von mRNA aus PBMCs erfolgte durch das Verwenden von TRIzol. $0,5-1 \times 10^7$ Zellen wurden in 1 mL TRIzol resuspendiert und nach der Zugabe von 200 μ L Chloroform 15 sec gevortext. Nach einer Zentrifugation bei 120000 xg (10 min; 4 °C) wurde die wässrige Phase entnommen. Die RNA wurde durch die Zugabe 0,5 mL eiskaltem Isopropanol gefällt. Für die weiteren Arbeitsschritte wurde das Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführungen entsprachen den Angaben des Herstellers.

3.2.2.3 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit den NucleoSpin Plasmid, NucleoBond Xtra Midi aus bakteriellen Übernachtskulturen in 2xYT Medium. Die DNA-Konzentration wurde anschließend fotometrisch durch Nutzung des Nanodrop ND-1000 bestimmt.

3.2.2.4 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde verwendet, um DNA mit Hilfe von zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primer) anzureichern¹⁹⁰.

Die präparative PCR wurde verwendet, um DNA zu amplifizieren, die im Anschluss in Vektoren kloniert werden sollte. Zur Überprüfung der Klonierungsschritte wurde die Kolonie PCR verwendet. PCR Protokolle und Zusammensetzungen sind in Tabelle 3-13 - Tabelle 3-14 dargestellt.

Tabelle 3-13: PCR Amplifikationsprotokoll

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Initiale Denaturierung	96	180
Denaturierung	96	30
Annealing	50-65	30
Elongation	72	60
		20-30 Zyklen

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Finale Elongation	72	300
Ende	16	∞

Tabelle 3-14: Zusammensetzung der PCR Reaktion

	Präparative PCR	Kolonie-PCR
Polymerase	Phusion (5 U/μL) 1x	Go Taq (1 U/μL)
Template	< 250 ng	0.5μg
Polymerase-Puffer	Phusion HF 1x	GoTaq Reaction buffer 1x
10 mM dNTPs	200 μM	200 μM
Primer (forward) 10 pmol/μL	0.5 μM	0.5 μM
Primer (reverse) 10 pmol/μL	0.5 μM	0.5 μM
dH ₂ O	variabel	variabel

3.2.2.5 Polymerase Kettenreaktion zur Generierung von Antikörperphagenbibliotheken

Die Amplifikation der Genabschnitte zur Generierung von Antikörpergenbibliotheken entspricht der von Hust *et al.* (2011) beschriebenen Durchführung¹³¹

3.2.2.6 Agarose Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA Fragmenten wurde die Agarose Gelelektrophorese angewendet. Die DNA Proben wurden in einem Agarosegel (0,7-2,0 % (w/v) Agarose; 25 mM Ethidiumbromid; 1x TAE) bei 130V, 300mA und 35 min aufgetrennt. Gele wurden unter UV Licht in der Geldokumentation fotografiert. Als Größenstandard wurde der GeneRuler 1 kB Plus verwendet.

3.2.2.7 Reinigung von DNA Proben

DNA Proben wurden nach Anweisungen des Herstellers mit dem Kit Nucleospin Extract gereinigt. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte fotometrisch durch Nutzung des Nanodrop ND-1000.

3.2.2.8 Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop

Die DNA Konzentration wurde mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

3.2.2.9 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Der Restriktionsverdau wurde mit Typ-II-Restriktionsendonukleasen durchgeführt. In

Tabelle 3-15 sind die Komponenten eines DNA Verdaus dargestellt.

Tabelle 3-15: Zusammensetzung des Restriktionsverdaus mit Endonukleasen

Komponente	Konzentration
DNA	1 μg
Restriktionsenzym I (10 U/μL)	1 U
Restriktionsenzym II (10 U/μL)	1 U
Puffer NEB1-4 10x	1x
BSA 100x	1x
dH ₂ O	variabel
Σ	50 μL

Nach dem Verdau wurden die Enzyme nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert. Endständigen 5'-Phosphatgruppen wurden durch Zugabe von *Calf Intestine Protease* (CIP) entfernt (2x 0,5 µL CIP; je 30 min bei 37 °C). Die DNA wurde im Folgenden gereinigt.

3.2.2.10 Ligation

DNA Fragmente wurden durch die T4 Ligase verknüpft. Das Vektor zu Insert Verhältnis ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

Formel 1: Berechnung zur Bestimmung des DNA zu Vektor Verhältnisses

$$Masse_{Insert} [ng] = \frac{3 \times Masse_{Vektor} [ng] \times Länge_{Insert} [bp]}{Länge_{Vektor} [bp]}$$

Ligiert wurde über Nacht bei 16°C. Die Hitzeinaktivierung der T4 Ligase erfolgte bei 65 °C für 10 min.

Tabelle 3-16: Zusammensetzung der Ligation

Komponente	Volumen [µL]
Vektor	$Masse_{Vektor}$
Insert	$Masse_{Insert}$
Ligase Puffer	1x
Ligase	1U
dH ₂ O	variabel
Σ	10,0

3.2.2.11 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden durch die Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Sequenzanalysen wurden mit dem Softwaretool Lasergene 8 durchgeführt.

3.2.3 Mikrobiologische Methoden

3.2.3.1 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Bakterien wurde im Fotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Als Referenz diente nicht beimpftes Medium.

3.2.3.2 Infektionstest zur Bestimmung des Phagentiters

Die Bestimmung des Phagentiters erfolgte durch Erstellung von Verdünnungsreihen produzierter Antikörperphagen. 10 µL unterschiedlicher Verdünnungen wurden im Anschluss genutzt, um 50 µL *E. coli* XL1-Blue MRF' (OD₆₀₀ = 0,5) zu infizieren. Die Bakterien wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend wurden 3x 10 µL auf 2xYT-GA Platten ausplattiert. Die Titer wurden anhand der Anzahl von Kolonien bestimmt.

3.2.3.3 Lagerung von Mikroorganismen (Glycerinstock)

Mikroorganismen wurden in 20% (v/v) Glycerin bei -80 °C gelagert.

3.2.3.4 Selektion von Antikörpern mittels Phagendisplay – TG1

Zur Selektion von Antikörpern mittels Phagendisplay wurden Antigene an Mikrotiterplatten, Immunotubes oder Beads immobilisiert. Zwischen 1 µg und 15 µg wurden über Nacht bei 4°C immobilisiert. Nicht immobilisiertes Antigen wurde gewaschen und Beads, MTPs oder Immunotubes mit 2 % MPBST für 1h bei RT wurden geblockt. Nach dem Blocken wurden Phagen (100x Überschuss zur Library Größe) hinzugefügt und für 2h inkubiert. Nicht gebundene Phagen wurden gewaschen, gebundene anschließend mit 100 µL Trypsin bei 37°C für 30 min eluiert. Die Phagen wurden im Anschluss verwendet, um 1000 µL *E. coli* TG1 (OD₆₀₀ = 0,5) zu infizieren. Die Infektion wurde bei 37°C für 30 min ohne schütteln und im Anschluss bei 37°C für 30 min bei 800 rpm durchgeführt. Es folgte die Zugabe von 4000 µL 2xYT-GA und eine Inkubation für 1h bei 37°C und 800rpm. Anschließend wurden die Bakterien mit Helferphage (M13K07) infiziert (MOI:1:20). Die Infektion wurde bei 37°C für 30 min ohne schütteln und im Anschluss bei 37°C für 30 min bei 800 rpm durchgeführt. Die Bakterien wurden anschließend bei 4000xg für 10 min bei RT pelletiert und in 5 mL 2xYT-KA aufgenommen. Die Phagenproduktion wurde ü.N. bei 30°C und 800 rpm durchgeführt. Es folgte die nächste Panning-runde. In dieser wurden 100 µL in 100 µL 2 % MPBST eingesetzt. In der Letzten Runde wurden die Bakterien nach Infektion mit eluierten Phagen auf 15 cm 2xYT-GA Platten plattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert. Klone konnten gepickt werden und wurden zur Produktion löslicher Antikörperfragmente genutzt.

3.2.3.5 Selektion von Antikörpern mittels Phagendisplay – XL1-Blue MRF'

Zur Selektion von Antikörpern mittels Phagendisplay wurden Antigene an Mikrotiterplatten, Immunotubes oder Beads immobilisiert. Immobilisiert wurde zwischen 1 µg und 15 µg über Nacht bei 4°C. Nicht immobilisiertes Antigen wurde gewaschen und Beads, MTPs oder Immunotubes mit 2 % MPBST für 1h bei RT geblockt. Nach dem Blocken wurden Phagen (100x Überschuss zur Library Größe) hinzugefügt und für 2h inkubiert. Nicht gebundene Phagen wurden gewaschen, gebundene anschließend mit 100 µL Trypsin bei 37°C für 30 min eluiert. Die Phagen wurden im Anschluss verwendet, um 130 µL *E. coli* XL1-Blue MRF' (OD₆₀₀ = 0,5) zu infizieren. Die Infektion wurde bei 37°C für 30 min ohne schütteln und im Anschluss bei 37°C für 30 min bei 800 rpm durchgeführt. Es folgte die Zugabe von 20 µL 10xGA und eine Inkubation ü.N. bei 30°C und 800rpm. Am nächsten Tag wurden 180 µL 2xYT-GA mit 10 µL der Übernachtskultur inokuliert und bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit Helferphage (M13K07) infiziert (MOI:1:20). Die Infektion wurde bei 37°C für 30 min ohne schütteln und im Anschluss bei 37°C für 30 min bei 800 rpm durchgeführt. Die Bakterien wurden anschließend bei 4000xg für 10 min bei RT pelletiert und in 180 µL 2xYT-KA

aufgenommen. Die Phagenproduktion wurde ü.N. bei 30°C und 800 rpm durchgeführt. Es folgte die nächste Panning-runde. In der letzten Runde wurden die Bakterien nach Infektion mit eluierten Phagen auf 15 cm 2xYT-GA Platten plattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert. Klone konnten gepickt werden und wurden zur Produktion löslicher Antikörperfragmente genutzt.

3.2.3.6 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Zur Transformation von *E. coli* wurden 50µL Bakterien des Stammes XL1-Blue MRF' 20 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden Ligationsansatz und Bakterien vereinigt, weitere 20 min auf Eis inkubiert und es folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec. Die Zellen wurden anschließend für 2 min auf Eis gelagert und dann nach Zugabe von 950 µL SOC Medium für 1 h bei 37°C und 600 rpm im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert.

3.2.3.7 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die Transformation von elektrokompenten *E. coli* erfolgte in 0,1 cm Elektroporationsküvetten (Biorad). 50 µL Bakterien wurden für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe des Ligationsansatzes und eine weitere Inkubation für 10 min. Das DNA/Bakterien-Gemisch wurde in eiskalte Küvetten gegeben und es folgte unmittelbar die Elektroporation (1,7 kV). Nach der Zugabe von 950 µL wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Es folgte das Ausplattieren auf Agarplatten.

3.2.3.8 Produktion von scFv- und scFab-Antikörperfragmenten in *E. coli*

Die Produktion von Antikörperfragmenten erfolgte im bakteriellen Expressionsvektor pOPE101-XP. Zur Produktion wurde 2xYT-A Medium mit einer Übernachtskultur beimpft ($OD_{600} \sim 0,1$) und die Produktion durch Zugabe von 50 µM IPTG induziert. Produziert wurde bei 30°C über Nacht.

3.2.3.9 Produktion von scFv- und scFab-Antikörperphagen für große Bibliotheken

Die Produktion der Antikörperphagen entspricht der von Hust *et al.* (2011) beschriebenen Durchführung¹³¹

3.2.4 Biochemische und –physikalische Methoden

3.2.4.1 Isolation der periplasmatischen Fraktion von *E. coli*

Zur Gewinnung von Antikörperfragmenten aus dem Periplasma wurde das Bakterienpellet nach der Produktion in 20 mL eiskaltem PE-Puffer für 20 min bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (20000 xg; 30 min) und die Präparation der OS Fraktion. Dazu wurde der Überstand entnommen, das Pellet in 20 mL eiskaltem OS-Puffer resuspendiert und für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (20000 xg; 30 min) wurden OS und PE Fraktion vereinigt.

3.2.4.2 Reinigung von Antikörperfragmenten mittels IMAC im Batch-Verfahren

Die Reinigung von Antikörperfragmenten mittels IMAC erfolgte durch die Zugabe von Imidazol und NaCl (Endkonzentration: 10 mM Imidazol; 0,5 M NaCl). Die Lösung wurde mit 1 mL Chelating Sepharose Fast Flow für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min; 500 g) wurde das Pellet vier Mal mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (4 mL) und eine Dialyse ü.N. bei 4 °C gegen PBS.

3.2.4.3 Reinigung von Proteinen mittels präparativer Größenausschlusschromatographie

Die präparative Größenausschlusschromatographie erfolgte an der Äkta Purifier mit der Säule HiLoad16-60 Superdex200 Increase bei einer Flussrate 0,75 mL/min bei 4°C. Das Fraktionsvolumen betrug 0,5 mL.

3.2.4.4 (SDS-)Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurden diese mit Laemmli Puffer versetzt. Für reduzierende Bedingungen wurde der Laemmli Puffer zusätzlich mit β -Merkaptoethanol (β -ME) versetzt. Proteinproben wurden für 10 min bei 95°C denaturiert, unter nicht reduzierenden Bedingungen für 20 min bei 56 °C. Die apparenten molekularen Massen wurden durch das Verwenden des Protein „Standards Precision Protein Ladder All Blue“ bestimmt. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA und 300 V für 45 min. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist in Tabelle 3-17 und Tabelle 3-18 beschrieben.

Tabelle 3-17: Zusammensetzung des Sammelgels

Komponente	Volumen [mL]
dH ₂ O	1
Acrylamidmix	0,26
1,0 M Tris HCl pH 6,8	0,20
10 % SDS	0,015
10 % APS	0,015
TEMED	0,002

Tabelle 3-18: Zusammensetzung des Trenngels

Acrylamidkonz.	8 %	10 %	12 %	15 %	18 %
Komponente	Volumen [mL]				
dH ₂ O	1,8	1,6	1,3	0,9	0,5
Acrylamidmix	1,1	1,3	1,6	2,0	2,4
1,5 M Tris HCl pH 8,8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10 % SDS	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
10 % APS	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
TEMED	0,003	0,002	0,004	0,002	0,002

Native Gele wurden ohne die Verwendung von SDS durchgeführt. Der pH Wert des Laufpuffers wurde an den pI Wert der Proteine angepasst.

3.2.4.5 Coomassiefärbung

SDS Gele wurden durch Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Dazu wurde die Coomassie Lösung mit dem Gel für 1 min in die Mikrowelle gestellt. Anschließend wurde das Gel mit 10 % Essigsäure über Nacht entfärbt.

3.2.4.6 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS PAGE wurden die Proteine auf eine zuvor aktivierte PVDF Membran transferiert. Das Blotten erfolgte mittels der Blottaparatur für 45 min bei einer Spannung von 20 V (77mA).

3.2.4.7 Immunfärbung

Die mittels Western Blot auf die PVDF Membran transferierten Proteine wurden durch eine Immunfärbung nachgewiesen. Die Membran wurde ü.N. bei 4 °C in 2 % MPBST gelagert. Es folgte eine Inkubation mit dem 1. Nachweisantikörper (1 h in 2 % MPBST bei RT) sowie ein Waschschriff mit PBS und die Inkubation mit dem 2. Nachweisantikörper (1 h in 2 % MPBST bei RT). Nach einem Waschriff folgte die Inkubation für 5 min in Substratpuffer. Die Banden wurden durch Inkubation mit 1/100 (v/v) NBT und 1/100 (v/v) BCIP visualisiert. Die Reaktion wurde mit Wasser gestoppt.

3.2.4.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wurde in 96 Kavitäten Platten der Firma Costa (Maxisorp) durchgeführt. Das Antigen wurde mit 100 µL PBS ü.N. bei 4°C auf der Platte immobilisiert. Zum Blocken wurden 300 µL 2 % MPBST verwendet (Inkubation für 1 h). Die Nachweisantikörper wurden in 100 µL PBS aufgenommen und für 1h in die Kavitäten gegeben. Gewaschen wurde 3x mit PBST im ELISA-Washer. Entwickelt wurde durch die Zugabe von 100 µL Entwicklerlösung. Die Farbreaktion wurde gestoppt durch die Zugabe von 100 µL Stopplösung. Vermessen wurden die Platten im Tecan Sunrise bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 620 nm).

3.2.4.9 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Europium

Als Alternative zum Nachweis über HRP wurde ein Nachweis von Europium durchgeführt. Die Durchführung entsprach den Anweisungen des Herstellers zum DELFIA Eu-DTPA-DTA Chelate and Europium Kit. Vermessen wurden die Platten im Tecan Ultra bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 620 nm).

3.2.4.10 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Kinetische Untersuchungen wurden mit dem Gerät Biacore 2000 durchgeführt. Verwendet wurden CM5 Chips, die nach Angaben des Herstellers genutzt wurden. Laufpuffer war HBS-EP Puffer. Das Gerät wurde nach Herstellerangaben bedient.

3.2.5 Zellbiologische Methoden

3.2.5.1 *Isolation von Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) aus Vollblut*

Zur Isolation von PBMCs aus Vollblut wurden den Donoren 42 mL Blut entnommen. Es folgte die Zugabe von 18 mL Hanks Medium. Das Gemisch wurde geteilt und jeweils 20 mL Ficoll wurden vorsichtig überschichtet. Nach einem Zentrifugationsschritt (1000 xg; 10 min; RT) wurden die PBMCs mit einer Pipette entnommen und in ein neues Falcon überführt. Es folgten zwei Waschschrte mit je 30 mL Hanks Medium (1000 xg; 10 min; RT). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung in 1 mL TRIzol aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

3.2.5.2 *Produktion von Proteinen in humanen Zellen*

Antikörperfragmente und Antikörperfusionsproteine wurden in HEK293-6E Zellen produziert. Die Suspensionszelllinie wurde bei einer Zelldichte von $1,3-2,0 \times 10^6$ Zellen/mL transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels Polyethylenimin (PEI). 25 µg DNA wurden mit 62,5 µL PEI vermennt und für 20 min inkubiert. Das PEI/DNA -Gemisch wurde zu 25 mL Zellen gegeben und die Produktion erfolgte für 5 Tage, 37 °C, 5 % CO₂-Begasung und 110 rpm in Kultivierungsmedium im Erlenmeyerkolben. An Tag drei wurde mit 25 mL Medium (0,5 & (w/v) TN1-Pepton) gefüttert.

4 Ergebnisse

4.1 Aufbau des scFab-Vektors

Die Basis des scFab Vektors war der etablierte scFv-Vektor pHAL14. Hust *et al.* (2007) generierten eine für das scFab-Format angepasste Variante¹⁸⁶. Zur Generierung der Bibliotheken wurde die Reihenfolge des His und Myc Tags durch Klonierung verändert. Anders als beim pHAL14 ist die dem Myc Tag im pHAL38 der His Tag nachgestellt. In Abbildung 15A ist schematisch die Vektorkarte dargestellt, die nach der Verpackung resultierende Phage in Abbildung 15B.

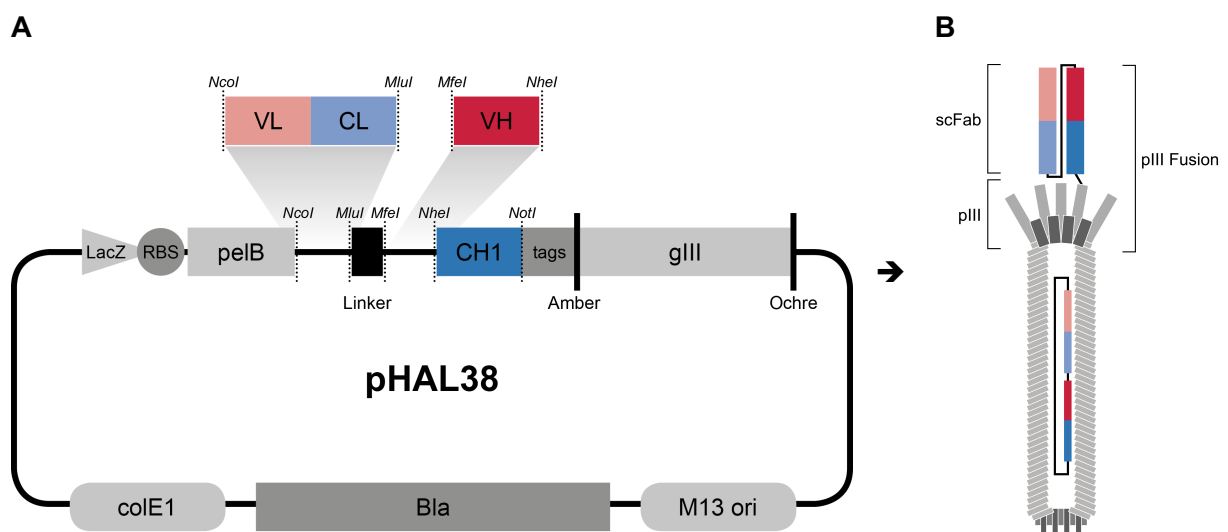


Abbildung 15: A: Aufbau des zur Klonierung verwendeten Phagemidvektors; B: Schematische Darstellung eines Phagen mit pIII::scFab Fusionsprotein.

Im Folgenden werden weitere Veränderungen im Design sowie der Nukleotid- und Aminosäuresequenz dargestellt, die in Bezug auf Displayrate, Produktion und Eignung für große Antikörperbibliotheken untersucht werden sollten.

4.1.1 Codonoptimierung für *E. coli*

Um den Einfluss der *Codon Usage* und die daraus resultierende Produktionsrate in der Selektion von Antikörperfragmenten in *E. coli* zu untersuchen, wurden zwei Vektorsysteme generiert. Die scFab-Vektoren pHAL38 und pHAL43 unterscheiden sich in der Nukleotidsequenz der CH1. Dieser Bereich wurde durch die Firma GeneArt auf eine optimale *Codon Usage* in *E. coli* angepasst.

Zur Generierung des pHAL43 wurde die Codon-optimierte konstante Domäne der schweren Kette wurde durch Gensynthese von der Firma GeneArt generiert, in den pHAL38 ligiert und

in *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung analysiert (Daten nicht gezeigt) und anschließend verifiziert.

Im weiteren Verlauf wurde die Möglichkeit der scFab Expression getestet und verglichen. Zu diesem Zweck wurde der Modellantikörper D1.3¹⁹¹ in beide Vektoren kloniert, die Sequenzen verifiziert und die Fragmente anschließend bakteriell exprimiert. Die Produktion der Antikörperfragmente wurde im Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 16).

Die Produktion des löslichen D1.3 scFab Antikörperfragmentes war sowohl im pHAL38 als auch im pHAL43 möglich. Die Produktivitäten unterschieden sich nicht. Die Größe der Fragmente war ~60 kDa. Auch der Nachweis der Kontrolle D1.3 scFv war möglich (~30 kDa).

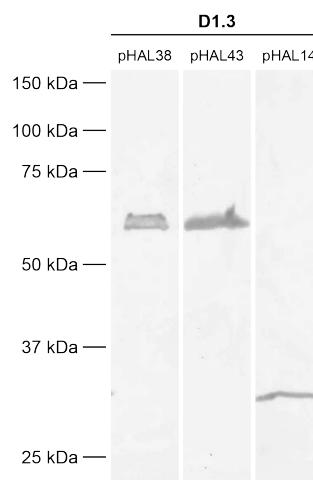


Abbildung 16: Analyse des produzierten Antikörperklons D1.3 als scFab im pHAL38 und pHAL43 sowie als scFv im pHAL14. Immunoblot eines 12 %igen SDS Gels zum Nachweis der Produktion löslicher Antikörperfragmente. Aufgetragen sind 10 μ L Produktionsüberstand. Der Nachweis erfolgte durch ein α -Myc-tag Antikörper (9E10) und einen Ziege- α -Maus IgG AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat.

Für weitere Analysen wurden zwei Testantikörpergenbibliotheken mit einer Diversität von 5×10^7 für pHAL38 und 8×10^7 für pHAL43 generiert. Die Testbibliotheken wurden durch Insert-Raten und Transformationseffizienzen charakterisiert (siehe 4.3).

Darüber hinaus wurde die Phagenverpackung beider Bibliotheken verglichen. Analysiert wurden Immunoblots von 200 zufällig ausgewählte Klone beider Bibliotheken (siehe 4.3.3) (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl der detektierbaren scFab::pIII Fusionen wurde für beide Bibliotheken ermittelt und ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Produktion der Phagen erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten (Abbildung 17).

Bei etwa 30 % des pHAL38 Vektorsystems und etwa 20 % des pHAL43-Vektorsystems ließen sich pIII-Fusionen produzierter Phagen nachweisen. Die Messpunkte der einzelnen Versuchsansätze unterscheiden sich hierbei nur in geringem Maße. Für die Kontrollen im scFv Vektor pHAL14 war es möglich bei etwa 30 % ein Fusionsprotein nachzuweisen. Die

vorliegenden Daten wurden mittels ungepaartem t-Test analysiert und unterscheiden sich signifikant ($p < 0.1$).

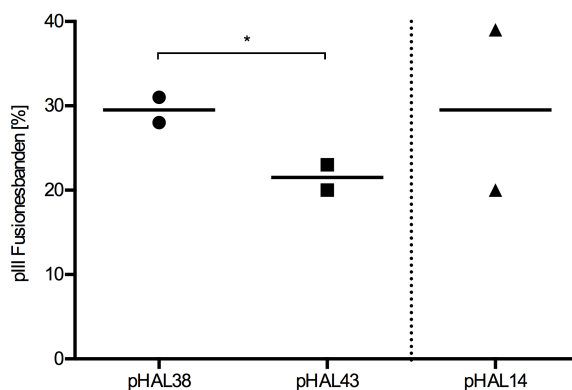


Abbildung 17: Detektierte pIII-Fusionsbanden im Immunoblot drei verschiedener Vektorsysteme zur Generierung von scFab und scFv Phagenbibliotheken.

4.2 Vorarbeiten zur Klonierung einer naiven scFab Bibliothek

Die Generierung der naiven scFab Bibliothek erforderte das Isolieren von Donor PBMCs. Es wurden schwere sowie leichte Ketten mittels PCR amplifiziert. Zur Klonierung der generierten Fragmente in den Phagemiden pHAL38 wurden Schnittstellen mittels PCR angefügt. DNA Banden mit einer Größe von etwa 700 bp für VL und 400 bp für VH wurden isoliert. Die Bibliotheken-Klonierung erfolgte mittels Ligation. Transformierte *E. coli* Subbibliotheken wurden zur Verpackung von Antikörperphagen verwendet.

4.3 Klonierung von zwei scFab Testbibliotheken und Analysen

Um das noch wenig charakterisierte Format des scFabs auf Kompatibilität mit dem vorhanden Vektorsystem zu prüfen, wurden Testbibliotheken generiert, Inserate und Größe bestimmt und die Phagemide durch das Verwenden von Helferphagen verpackt. Der Nachweis der Antikörperpräsentation durch das pIII Fusionsprotein erfolgte mittels Immunoblot. Die Testbibliotheken wurden im Folgenden für eine Antikörperphagen basierte Selektion eingesetzt. Binder wurden bakteriell und in Säugerzellen produziert und biochemisch analysiert und charakterisiert.

4.3.1 Bestimmung der Transformationseffizienz und Diversität

Die Generierung der Testbibliotheken erfolgte über eine Zweischritt-Klonierung. Es wurden die Phagemide pHAL38 und pHAL43 sowie das gereinigte PCR-Amplifikat von vier zufällig ausgewählten Spendern der leichten Ketten enzymatisch verdaut und beides ligiert. Die leichten Ketten Kappa und Lambda wurden separat kloniert. Die Transformation der Phagemide erfolgte mittels Elektroporation in den kompetenten *E. coli* Stamm XL1-Blue MRF'. Die Transformationseffizienz wurde durch das Auszählen von Kolonien bestimmt. Die

Bestimmung der Klonierungseffizienz erfolgte über Kolonie PCR (Daten nicht gezeigt). Zur Klonierung der schweren Kette wurden die Plasmide erneut enzymatisch verdaut und VH (ebenfalls ein Pool von vier zufällig ausgewählten Spendern) kloniert. Die Transformationseffizienz wurde erneut durch das Auszählen von Kolonien bestimmt. In Abbildung 18 sind Einzeltransformationen und die Gesamtgrößen der pHAL38- und pHAL43-Bibliotheken unterteilt in Lambda und Kappa dargestellt.

Die Transformationseffizienzen lagen bei der pHAL38 Testbibliothek im Bereich von 4×10^6 cfu bis 1.3×10^7 cfu und unterschieden sich leicht von den Transformationseffizienzen der pHAL43 Bibliothek, die im Bereich von 3×10^6 cfu bis maximal 2×10^7 cfu lagen. Die Summe aus Kappa und Lambda Bibliotheken ergaben für pHAL38 eine Bibliotheken-Größe von etwa 5×10^7 cfu, für pHAL43 von etwa 8×10^7 cfu.

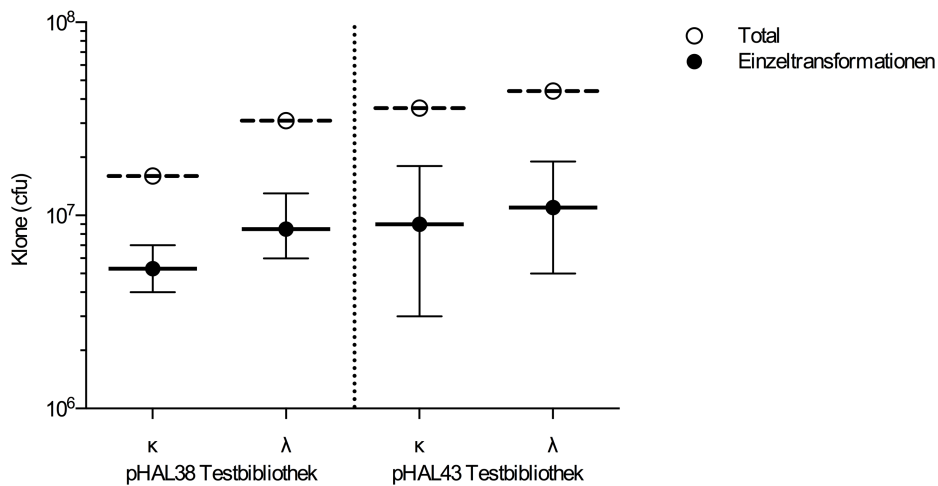


Abbildung 18: Transformationsraten und Gesamtbibliothekengrößen der pHAL38 und pHAL43 Testbibliotheken.

4.3.2 Insert-Rate

Zur Bestimmung der Voll-Längen Insert-Raten wurden Kolonie-PCRs der einzelnen Subbibliotheken durchgeführt und gelelektrophoretisch untersucht. Die Insert-Raten im Mittel sowie deren Minima und Maxima sind in Abbildung 19 dargestellt.

Die Voll-Längen Insert-Raten der scFab Testbibliotheken lagen im Bereich von 80 % für die pHAL38 Library Klonierung und ca. 70 % bei pHAL43. Des Weiteren sind die Insert-Raten der gut charakterisierten HAL7/8 scFv Bibliothek dargestellt¹³¹. Die Insert-Raten der beiden Testbibliotheken unterscheiden sich nicht signifikant von den dargestellten scFv Bibliotheken.

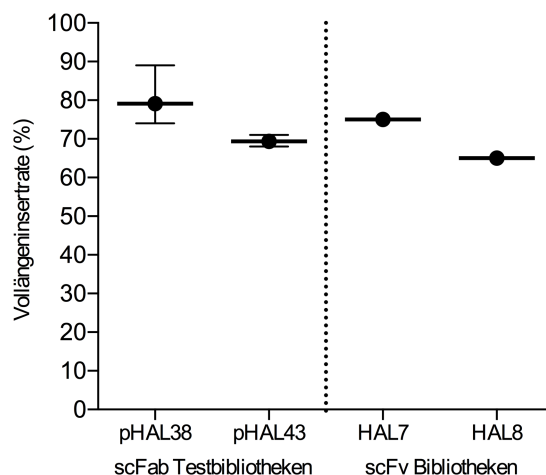


Abbildung 19: Voll-Längen Insert-Raten ermittelt durch Kolonie PCR der Testbibliotheken in pHAL38 und pHAL43 sowie der scFv Antikörperbibliotheken HAL7 und HAL8¹³¹.

4.3.3 Verpackung der Testbibliotheken

Die Subbibliotheken wurden zur Verpackung vereinigt und sowohl mit M13K07 als auch mit Hyperphage verpackt. Titer wurden durch einen *E. coli*-Infektionstest bestimmt. Das Ergebnis der Titerbestimmung ist in Abbildung 20 dargestellt.

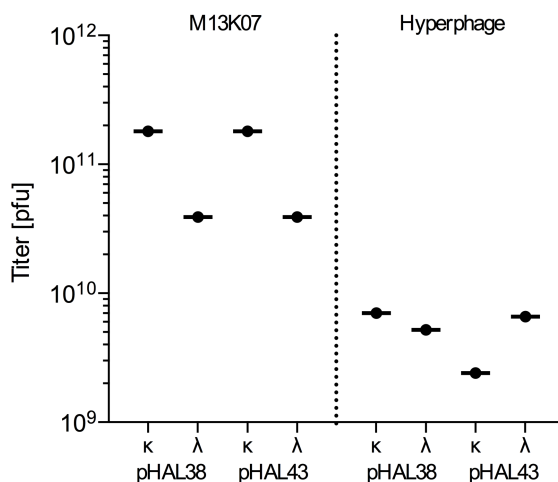


Abbildung 20: Ermittelte Titer der scFab Bibliotheken auf Basis des pHAL38 und pHAL43 nach der Verpackung mit M13K07 und Hyperphage.

Die Titer der scFab-Testbibliotheken lagen für pHAL38 und pHAL43 im Bereich von 4×10^{10} – 2×10^{11} pfu/mL. Die Antikörperphagentiter der Lambda Bibliotheken waren etwa um den Faktor 5 geringer als die für Kappa. Die mit Hyperphage verpackten Phagentiter der Testbibliotheken unterscheiden sich deutlich von den zuvor genannten. Die Titer lagen im Bereich von 2×10^9 – 8×10^9 pfu/mL.

4.3.4 Antikörperpräsentation

Zur Bestimmung der Antikörperpräsentation durch das pIII-Fusionsprotein wurde ein Immunoblot zum Nachweis des pIII Phagenproteins durchgeführt. Der Nachweis des pIII Proteins erfolgte im Immunoblot (Abbildung 21).

In allen aufgetragenen Proben ließ sich bei ~130 kDa eine pIII-Fusionsbande nachweisen. Bei ~60 kDa lief das pIII Protein der Wildtypphage. Unterschiede in der Laufhöhe dieser Bande waren bei den Hyperphage und den M13K07 verpackten Phagen zu erkennen. Zudem wurden viele nicht definierbare Proteine detektierbar, welche insbesondere bei den mit M13K07 verpackten Bibliotheken intensiver und vermehrt auftraten.

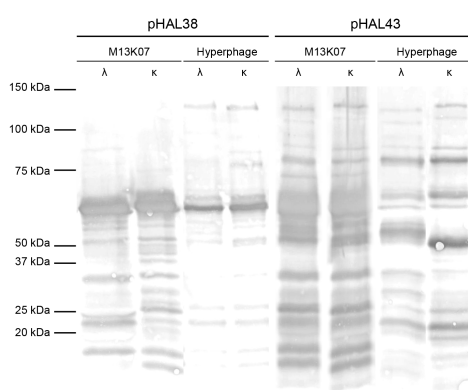


Abbildung 21: Analyse der Antikörperfusionen in den scFab-Bibliotheken auf Basis der Vektoren pHAL38 und pHAL43. Immunoblot eines 12 %igem SDS Gels zum Nachweis der Produktion löslicher Antikörperfragmente. Aufgetragen sind 10 μ L Produktionsüberstand. Der Nachweis erfolgte durch ein α -Myc-Tag Antikörper (9E10) und einen Ziege anti-Maus IgG AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat.

4.3.5 Panning

Die verpackten scFab Testbibliotheken auf Basis des pHAL38 wurden auf Anwendbarkeit in der Antikörperphagenselektion getestet. Diese erfolgte für Kappa und Lambda separat in drei Selektionsrunden gegen die in MTPs immobilisierten Antigene JNK2 und Lysozym. Es wurde eine Präinkubation auf Streptavidin durchgeführt.

Nach der Selektion wurden lösliche Antikörperfragmente von Einzelklonen bakteriell produziert und auf spezifische Bindung im ELISA getestet (Abbildung 22).

Zur Bestimmung der spezifischen Bindung wurden Einzelklone auf dem Antigen und auf einem Kontrollantigen im ELISA getestet. Grafisch dargestellt in Abbildung 22A ist das Ergebnis des Antigen ELISAs der Lambda Bibliothek auf Basis des pHAL38. Für den Großteil der getesteten Einzelklone konnte ein ELISA Signal gemessen werden, welches signifikant über dem des getesteten Kontrollantigens (Streptavidin) lag. Für sieben Klone der Kappa Testbibliothek (siehe Abbildung 22C) war ein Signal zwischen 0,1 und 0,6 auf dem Antigen auf JNK2 detektierbar. Alle sieben Klone gaben auch auf dem Kontrollantigen

Streptavidin ein deutliches Signal. Die Ergebnisse des Nachweises auf Bindung der pHAL 38 und pHAL 43 Testbibliotheken gegen das Antigen Lysozym sind in Abbildung 22B und D dargestellt. In beiden Experimenten konnten keine signifikanten ELISA Signale gemessen werden, die sich deutlich vom Hintergrund unterschieden.

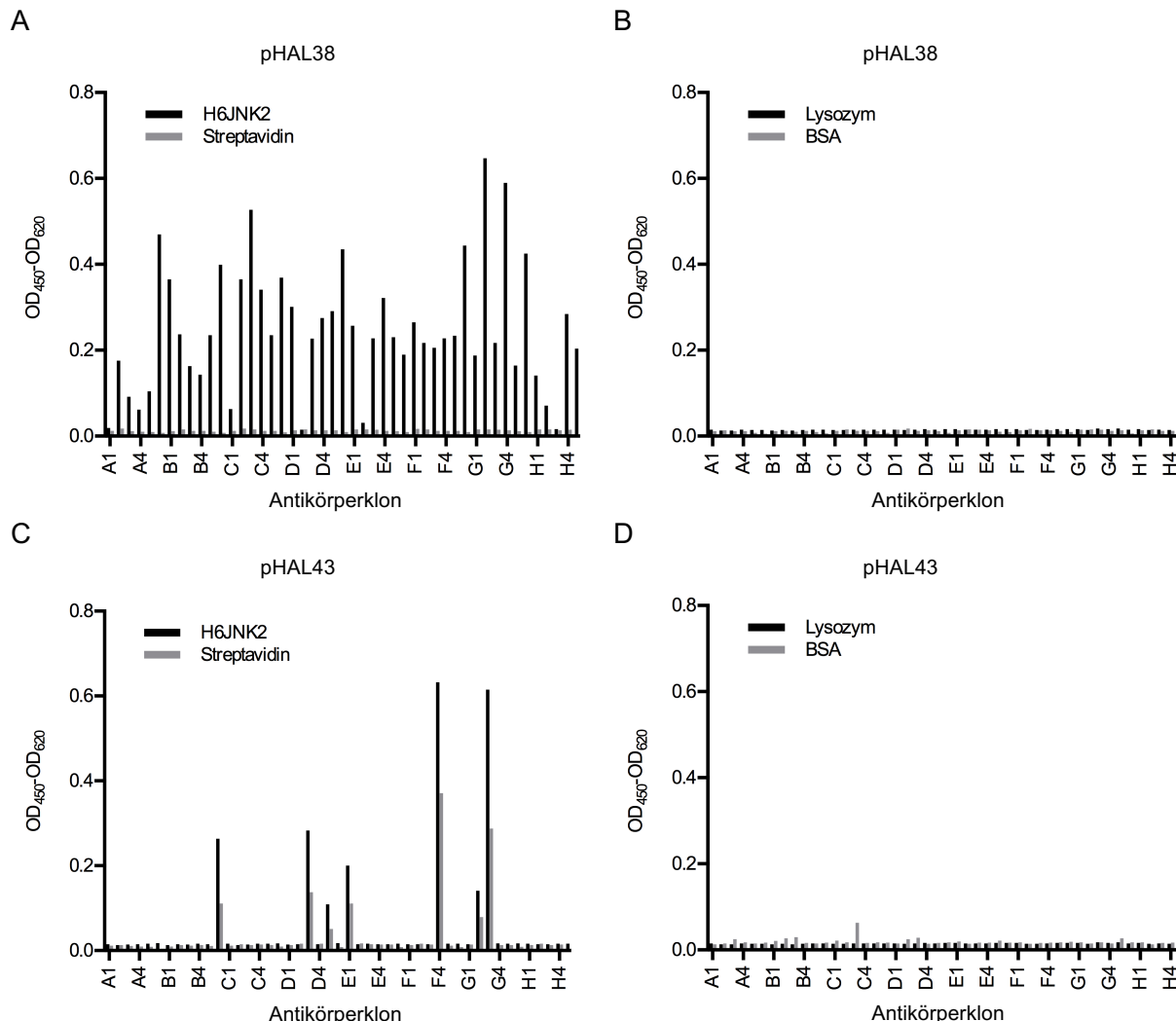


Abbildung 22: Screenings nach der Selektion mit den scFab Testbibliotheken auf Basis von pHAL38 und pHAL43; 100 ng immobilisiertes Antigen wurde mit 100 μ L bakteriell exprimierten scFab inkubiert. Der Nachweis erfolgte über einen Maus anti-C-Myc-tag Antikörper und einen Ziege α -Maus IgG (Fab-spezifischen) HRP-konjugierten Antikörper und TMB-Substrat; A: Screening von 48 scFab Fragmenten der Bibliothek auf Basis des pHAL38 gegen das Antigen JNK2 und die Kontrolle Streptavidin; B: Screening von 48 scFab Fragmenten der Bibliothek auf Basis des pHAL38 gegen das Antigen Lysozym und die Kontrolle Streptavidin; C: Screening von 48 scFab Fragmenten der Bibliothek auf Basis des pHAL43 gegen das Antigen JNK2 und die Kontrolle Streptavidin; D: Screening von 48 scFab Fragmenten der Bibliothek auf Basis des pHAL43 gegen das Antigen Lysozym und die Kontrolle Streptavidin.

4.3.6 Charakterisierung der Binder

Zur weiteren Charakterisierung wurden Plasmidpräparationen der in 4.3.5 selektierten Antikörperfragmente gegen JNK2 angefertigt und durch Sequenzierung analysiert. Die Antikörpersequenz der untersuchten Klone war in allen Fällen identisch (nicht dargestellt). Für weitere Analysen wurde der Klon FLT059-B6 verwendet.

Klon FLT059-B6 wurde bakteriell produziert und der Überstand im ELISA auf dem Antigen JNK2 sowie den Kontrollproteinen Streptavidin und BSA getestet. Der Überstand wurde titriert. Die Ergebnisse des ELISAs sind in Abbildung 23 dargestellt.

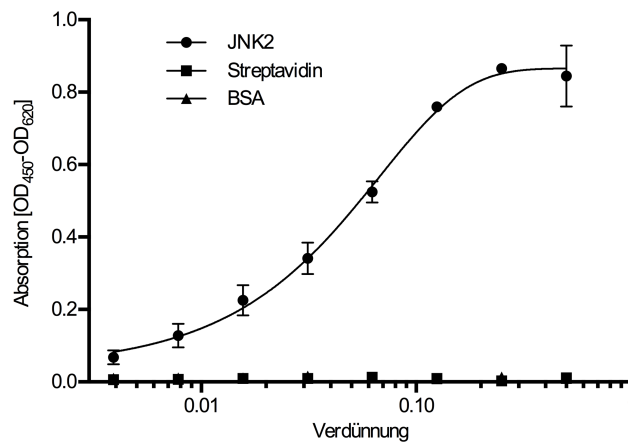


Abbildung 23: Bindung des Klonen FLT059-B6 als scFab an das rekombinante Antigen H6JNK6 im ELISA zur Überprüfung der Spezifität. Jeweils 100 ng/Kavität JNK2, Streptavidin bzw. BSA als Kontrolle wurden immobilisiert und mit 100 μ L Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:2 mit MPBS-T titriert. Der Nachweis erfolgte über einen Maus α -Myc-tag Antikörper und einen Ziege α -Maus IgG (Fab-spezifisch) HRP-konjugierten Antikörper und TMB-Substrat.

Klon FLT059-B6 hat spezifisch an das Antigen JNK2 gebunden. Zur Analyse des Klons FLT059-B6 gegen JNK2 im scIgG Format wurde dieser in den Expressionsvektor pCSE2.5hlgG1 kloniert und anschließend durch Sequenzierung analysiert und verifiziert. Die transiente Expression fand durch Transfektion der Zelllinie HEK293-6E Zellen statt. Das Kulturvolumen betrug 25 mL und es wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen/mL transfiziert. Kultiviert wurde für fünf Tage, wobei nach zwei Tagen die Zugabe von 25mL Medium + TN1 erfolgte. Der Überstand wurde mit dem Profinia System mittels einer Protein A gereinigt. Das Elutionsvolumen betrug 4 mL. Es konnte unter den genannten Bedingungen der Klon FLT059-B6 als scIgG in einer Konzentration von 0.1 mg/mL produziert und gereinigt werden. Die Validierung der Antikörperproduktion wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt (Abbildung 24A). Die Reinheit sowie das Aggregationsverhalten des produzierten Klons wurden chromatographisch analysiert. In Abbildung 24B dargestellt ist das Chromatogramm von 100 μ g Protein analysiert durch SEC.

Im SDS-Gel konnte ein Protein mit einer Größe von etwa 90 kDA nachgewiesen werden. Keine weiteren Banden waren detektierbar. Die SEC-Analyse ergab zwei eindeutige Peaks, die durch das vorherige Kalibrieren der Säule mit einer Größe von 177 kDA und 47 kDA bestimmt werden konnten. Darüber hinaus waren zwei Schultern detektierbar, die den Größen von 124 kDA und 103 kDA zugeordnet werden konnten.

Die Bindungseigenschaften des Klon FLT059-B6 als scIgGs wurden im ELISA getestet. Unten dargestellt (Abbildung 25A) ist die Bindung von Antikörper auf immobilisiertem

Antigen. In Abbildung 25B dargestellt ist der Nachweis des Antigens im Immunoblot sowie ein Test auf Kreuzreaktivität.

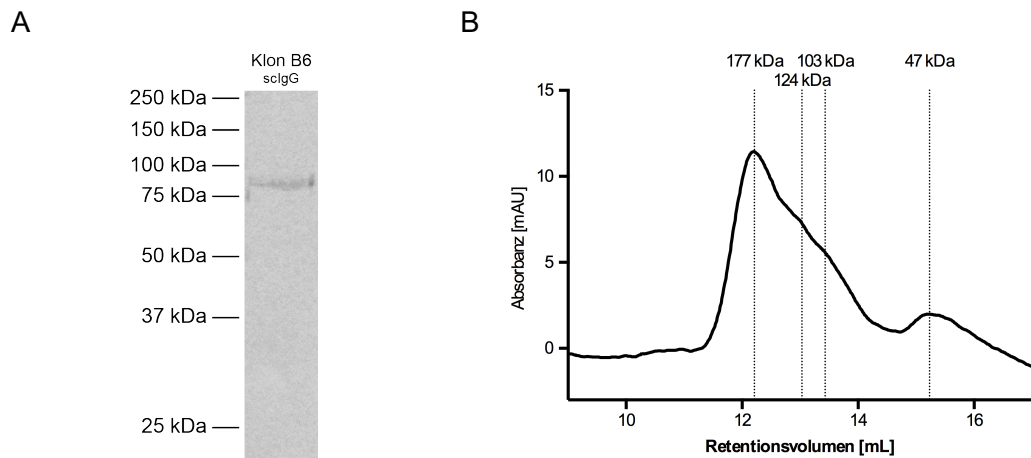


Abbildung 24: Analysen des produzierten Antikörperklons FLT059-B6 als scIgG; A: Immunoblot eines 12 %igen SDS Gels zum Nachweis der Produktion eines scIgG nach der Affinitätsreinigung. Aufgetragen sind 10 µL gereinigtes Protein. Der Nachweis erfolgte durch ein Ziege anti-Maus Maus (Fc-spezifisch) AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat; B: Größenausschlusschromatographie des Antikörperklons FLT059-B6 als scIgG. Es wurde die Säule HiLoad10/300 Superdex200 Increase und eine Flussrate von 0,7 mL/min verwendet.

Für den Antikörper FLT059-B6 im scIgG Format konnte eine spezifische Bindung an das Antigen im ELISA demonstriert werden (Abbildung 25A).

In Abbildung 25B war die Bindung des Antikörpers gegen JNK2 unter reduzierenden und unter nicht-reduzierenden Bedingungen möglich. Auf A549 Zelllysate sind unter den gewählten keine Proteine detektierbar. Zur Kontrolle wurde der Sekundärantikörper auf dem Antigen JNK2 und dem Zelllysate getestet. Hier waren ebenfalls keine Proteine detektierbar. JNK2 konnte im Zelllysate nicht nachgewiesen werden.

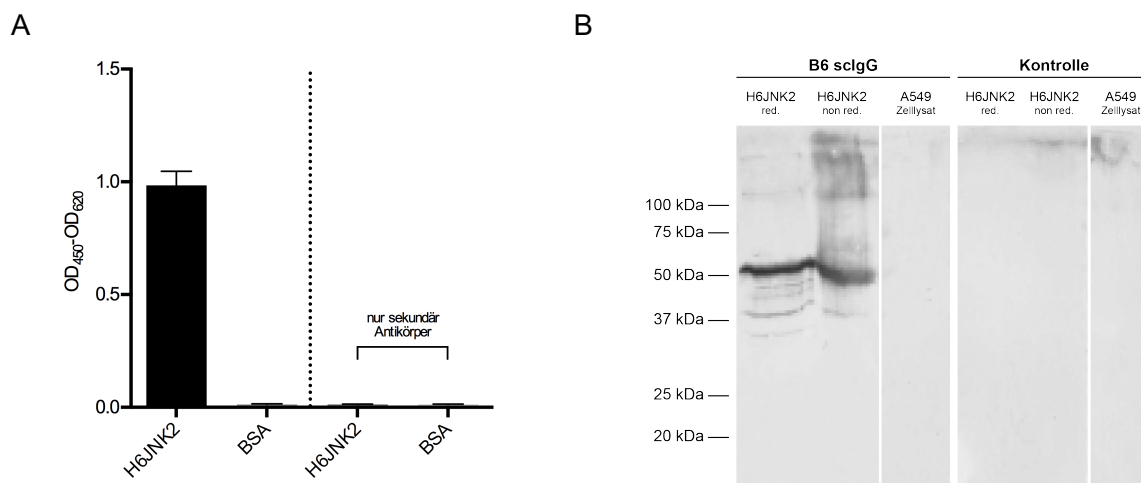


Abbildung 25: Analysen des produzierten Antikörperklons FLT059-B6 als scIgG; A: Bindung des Klonen FLT059-B6 als scIgG an das rekombinante Antigen H6JNK6 im ELISA zur Überprüfung der Spezifität. Jeweils 100 ng/Kavität JNK2, Streptavidin bzw. BSA als Kontrolle wurden immobilisiert und mit jeweils 1 µg Antikörper inkubiert. Der Nachweis erfolgte über einen Maus α-Myc-tag Antikörper und einen Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifischen) HRP-konjugierten Antikörper und TMB-Substrat. B: Immunoblot eines 12 %igen SDS-Gels zum Nachweis der Spezifität löslicher Antikörperfusionen.

4.4 Klonierung einer naiven scFab-Phagenbibliothek und Analysen

Wie in Abschnitt 4.3 dargestellt, konnte auf Basis des pHAL38 erfolgreich eine scFab Testbibliothek kloniert werden. Darüber hinaus war es möglich Antikörperfragmente auf Phagen zu präsentieren und lösliche scFabs bakteriell zu produzieren. Das Antikörperfragment FLT059-B6 ging erfolgreich aus einer Antikörperphagenselektion hervor und die spezifische Bindung konnte validiert werden.

Auf dieser Basis wurde eine naive scFab Bibliothek aus 96 Spendern im Phagemid pHAL38 kloniert. Die Durchführung entsprach der in 4.3 geschilderten Strategie und Durchführung.

4.4.1 Bestimmung der Transformationseffizienz und Diversität

Wie bereits für die Erstellung der Testbibliotheken beschrieben, wurde für die Generierung der Bibliothek die VL (Lambda und Kappa) separat kloniert. Unten dargestellt (Abbildung 26) sind die Gesamttransformationen sowie die durchschnittliche Transformationseffizienz. Ansätze mit einer Transformationseffizienz $< 10^6$ cfu wurden verworfen und sind nicht Bestandteil der Bibliothek (Abbildung 26).

Im Durchschnitt lag die Transformationseffizienz bei $\sim 2 \times 10^7$ cfu ($\sim 1 \times 10^6$ cfu - 8×10^7 cfu). HAL11 (Kappa) und HAL12 (Lambda) zusammen ergaben eine Gesamtgröße von $\sim 10^{10}$ cfu, wobei beide etwa gleich groß waren. Zur Erstellung der Bibliotheken wurden 220 Einzeltransformationen für Kappa und 145 für Lambda durchgeführt.

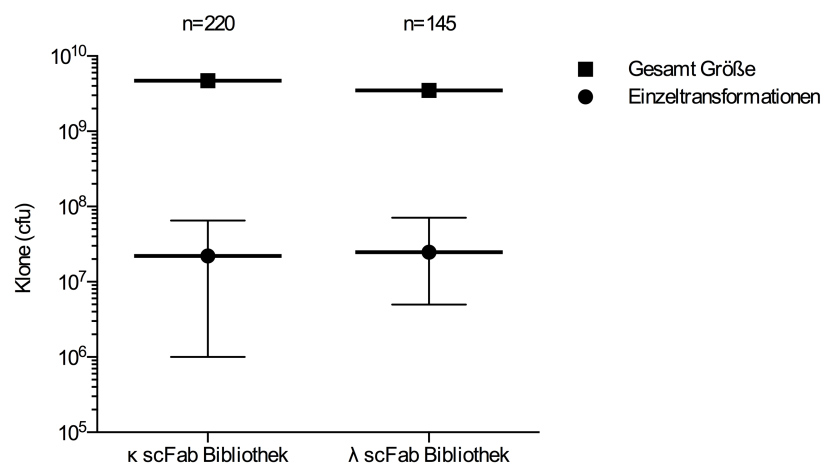


Abbildung 26: Diversität der generierten scFab-Antikörpergenbibliotheken aufgeteilt in Kappa und Lambda und Transformationsraten der Einzeltransformationen.

4.4.2 Insert Rate

Die Bestimmung der Voll-Längen Insert-Raten erfolgte wie in Abschnitt **Fehler!** **Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** dargestellt, mittels PCR. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse dargestellt.

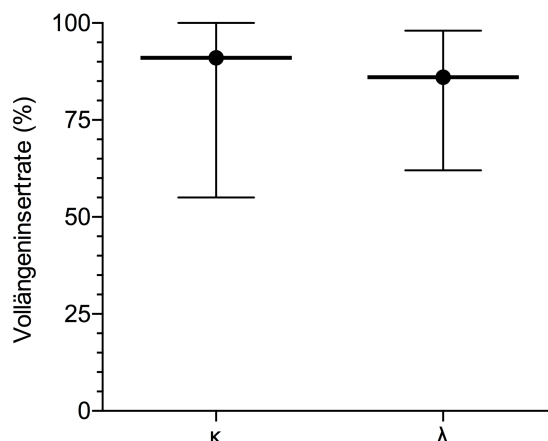


Abbildung 27: Voll-Längen Insert-Raten der generierten scFab Antikörpergenbibliotheken aufgeteilt in Kappa und Lambda.

Die Voll-Längen Insert-Raten beider Bibliotheken waren im Mittel 85 % (Kappa) und 90 % (Lambda) und setzten sich aus Werten der Einzeltransformationen von 55 % bis 100 % zusammen.

4.4.3 Verpackung im Kleinmaßstab und pIII Fusionsprotein der Subbibliotheken

Zur weiteren Charakterisierung der Bibliotheken wurden die Einzeltransformationen in Subbibliotheken vereinigt (8x Kappa; 6x Lambda). Die einzelnen Subbibliotheken wurden mit Hilfe der Hyperphage verpackt. Der Phagentiter wurde durch einen *E. coli* Infektionstest bestimmt (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Übersicht der Phagentiter nach Verpackung der Subbibliotheken der generierten scFab Antikörpergenbibliotheken aufgeteilt in Kappa und Lambda

Subbibliotheken	Titer (pfu/mL)	
	HAL11 κ Bibliothek	HAL12 λ Bibliothek
1	$2,0 \times 10^{11}$	$5,0 \times 10^9$
2	$2,0 \times 10^{11}$	$8,0 \times 10^{10}$
3	$1,2 \times 10^{11}$	$2,0 \times 10^{12}$
4	$1,2 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^{11}$
5	$4,0 \times 10^{10}$	$8,0 \times 10^{10}$
6	$2,8 \times 10^{11}$	$4,4 \times 10^{11}$
7	$1,2 \times 10^{11}$	-
8	$3,0 \times 10^{11}$	-
Durchschnitt	$1,7 \times 10^{11}$	$5,8 \times 10^{11}$

Verpackt wurden acht Kappa und sechs Lambda Subbibliotheken mit einer Gesamtdiversität von $\sim 10^{10}$. Die ermittelten Phagentiter waren im Bereich von 5×10^9 pfu/mL und 2×10^{12} pfu/mL. Die mittlere Verpackungsrate für die Kappa- lag bei $\sim 1,7 \times 10^{11}$ pfu/mL für Lambda Subbibliotheken bei $5,8 \times 10^{11}$ pfu/mL.

Die Präsentation des pIII Fusionsproteins sollte für die produzierten Phagen untersucht werden. 10^9 Phagen wurden mit Laemmli-puffer versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C

denaturiert. In Abbildung 28 dargestellt sind Immunoblots der Kappa und Lambda Subbibliotheken.

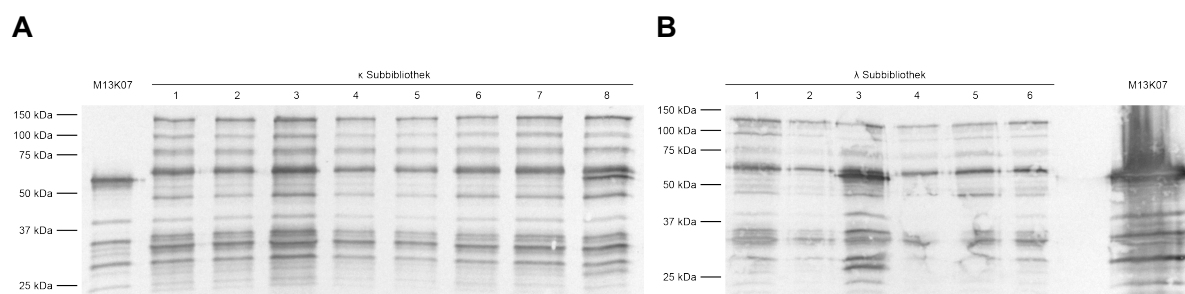


Abbildung 28: Analyse der Antikörperfusionen in den scFab Subbibliotheken aufgeteilt nach Kappa und Lambda. Immunoblot eines 12 %igen SDS Gels zum Nachweis der pIII Fusionen. Aufgetragen sind 1×10^9 Phagen nach der Fällung durch PEG/NaCl. Der Nachweis erfolgte durch einen Ziege anti-Maus Maus (Fc-spezifisch) AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat.

In allen Spuren ließen sich durch den α -pIII-Antikörperphagen nachweisen. Das Bandenmuster der Kappa Subbibliotheken unterscheidet sich zu dem der M13K07 Kontrolle (Abbildung 28A). Weitere Proteine mit Größen zwischen 75 kDa und 150 kDa konnten nachgewiesen werden. In Abbildung 28B ist der Immunoblot der produzierten Phagen aller Lambda Subbibliotheken dargestellt. Das Bandenmuster der hier aufgetragenen Phagen entspricht dem der Kappa Subbibliotheken.

4.4.4 Verpackung im Großmaßstab und Nachweis der Fusionsbanden

Die Verpackung im Großmaßstab erfolgte mit Hilfe der Hyperphage und einem Produktionsvolumen von 600 mL. Zur Titerbestimmung wurden die HAL11 (Kappa) und HAL12 (Lambda) Subbibliotheken zu gleichem Mengen vereinigt. Anschließend wurde der Titer durch einen *E. coli* Infektionstest bestimmt (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Ermittelte Phagentiter der Antikörpergenbibliotheken HAL11 und HAL 12 nach der Fällung durch PEG/NaCl

Titer	
HAL11 κ Bibliothek	HAL12 λ Bibliothek
$2,9 \times 10^{12}$	$2,4 \times 10^{12}$

Die Titer der HAL11/12 Bibliotheken sind vergleichbar und liegen im Bereich von $2-3 \times 10^{12}$ pfu/mL. Die Präsentation der pIII Fusionsproteine wurde erneut durch einen Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 29). 1×10^9 Phagen wurden mit Laemmli Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Der Nachweis erfolgte über einen α -pIII-Antikörper.

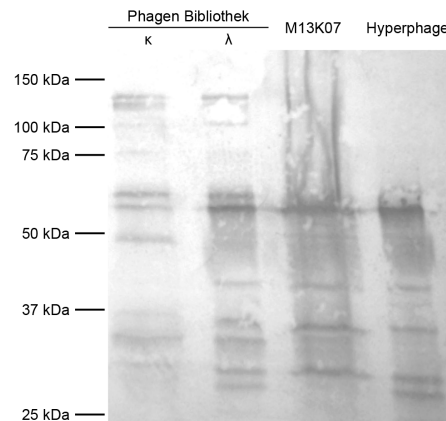


Abbildung 29: Analyse der Antikörperfusionen in den scFab Bibliotheken HAL11 und HAL 12. Immunoblot eines 12 %igen SDS-Gels zum Nachweis der pIII-Fusionen. Aufgetragen sind 1×10^9 Phagen nach der Fällung durch PEG/NaCl. Der Nachweis erfolgte durch einen Ziege anti-Maus (Fc-spezifisch) AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat.

In allen Ansätzen konnten Phagen nachgewiesen werden (Abbildung 29). Das Bandenmuster der Kappa Subbibliotheken unterschied sich zu dem der M13K07. Drei zusätzliche Banden waren im Bereich zwischen 75 und 150kDa detektierbar. pIII Fusionsbanden waren im Bereich von 130 kDa klar erkennbar.

4.4.5 Bibliothekendiversität

Das Auftreten der einzelnen Keimbahnsequenzen vor und nach der Phagenverpackung in der Bibliothek sollte untersucht werden. Hierzu wurden randomisiert jeweils 300 Klone aus HAL11 und HAL12 gewählt und durch Sequenzierung analysiert. Des Weiteren wurden *E. coli* XL1-Blue MRF' mit Library Phagen infiziert und ebenfalls jeweils 300 Klone sequenziert. Die Analyse der Keimbahnverteilung wurde mit Hilfe des Webtools vbase2¹⁹² durchgeführt (Abbildung 30).

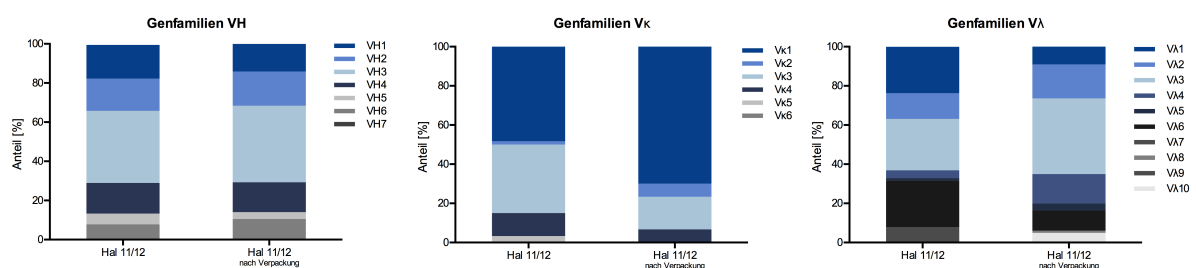


Abbildung 30: Verteilung der Genfamilien in den scFab Bibliotheken HAL11 und HAL12 vor und nach der Phagenverpackung ermittelt durch Sequenzierung.

Den größten Teil für VH ermittelten Keimbahnen der unverpackten Bibliotheken (HAL11 und HAL12) machte VH3 aus. VH1, VH2 und VH4 waren etwa zu gleichen Anteilen zu finden. Den kleinsten Anteil machte VH5 und VH6 aus. VH7 konnte in den untersuchten Klonen nicht identifiziert werden. Nach der Verpackung sah die Verteilung nahezu identisch aus. Der Anteil an VH3 war etwas gestiegen, der an VH5 und VH6 hingegen gesunken.

Den größten Teil in HAL11 machten die Keimbahnen Vκ1 und Vκ3 aus. Kleiner war der Anteil von Vκ2, Vκ4 und Vκ5. Keine Klonen der Keimbahn Vκ6 konnten detektiert werden. Nach der Phagenverpackung war Vκ1 um etwa 15 Prozent gestiegen, Vκ3 um etwa diesen Anteil geschrumpft und Vκ4 etwa identisch. Bei den verpackten Phagen konnten die Keimbahnen Vκ5 und Vκ6 nicht ermittelt werden.

Die am häufigsten auftretenden Keimbahnen in der HAL12 waren Vλ1, Vλ3 und Vλ6, gefolgt von Vλ2, Vλ7 und Vλ9. Antikörpergene der Keimbahnen Vλ4, Vλ5 Vλ8 und Vλ10 konnten nicht nachgewiesen werden. Nach der Verpackung war sich der Vλ3 Anteil etwa verdoppelt, Vλ4 ungefähr verdreifacht. Der Anteil an Vλ1 war um die Hälfte gesunken. Zudem waren nach der Verpackung ein geringer Teil an Vλ8, Vλ9 und Vλ10 zu finden.

4.5 Selektion von Antikörperfragmenten mittels Phagendisplay

Nach abgeschlossener Klonierung und Verpackung der scFab-Bibliothek sollte die Anwendbarkeit in der Antikörperphagenselektion getestet werden. Zunächst wurden alle Parameter der Selektion einem etablierten Protokoll der scFv-Antikörpergenerierung angepasst. Auf diese Weise wurde über drei Panning-Runden unter Verwendung des *E. coli* Stammes XL1-Blue MRF' selektiert. Wie für die scFv Selektion etabliert, wurde auch für das scFab-Panning zunächst der Helferphage M13K07 in allen Selektionsrunden verwendet.

4.5.1 Verwendete Antigene und Eigenschaften

Um die Qualität und die Vielseitigkeit der scFab-Bibliothek zu testen, wurden verschiedene Antigene und Strategien für die Antikörperphagenselektion gewählt. Es wurden intra- und extrazellulär vorkommende Proteine sowie unterschiedliche Peptide ausgewählt. Des Weiteren wurde versucht Antikörper gegen Bead-, Mikrotiterplatten- und Immunröhrchen-gekoppelte Antigene zu generieren. Die Antigene waren teilweise mit einem murinen oder humane Fc-Teil fusioniert oder biochemisch biotinyliert. Für das Screening im ELISA wurden lösliche Antikörperfragmente sowie ganze Phagenpartikel verwendet. In Tabelle 4-3 ist eine Übersicht der verwendeten Antigene sowie deren Eigenschaften dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 4-3: Übersicht der verwendeten Antigene zur Antiörperphagenselektion sowie deren Eigenschaften.

#	Antigen	Peptid	Protein	Tag	Biotin	Anzahl der Pannings	MTP	Bead	Immunotube	lösliche scFab Screening	Phagen Screening	Binder
1	4-1BB		•	hlgG1-Fc		4	•	•		•	•	
2	aBeta	•				3	•	•		•	•	
3	CD27		•	hlgG1-Fc		4	•	•		•	•	
4	CD30		•	hlgG1-Fc		4	•	•		•	•	
5	CD33		•	hlgG1-Fc		7	•	•		•	•	
6	CD40		•	hlgG1-Fc		4	•	•		•	•	
7	CEA/CD66E		•	hlgG1-Fc		5	•	•		•	•	
8	CEACAM1		•	hlgG1-Fc		5	•	•		•	•	
9	EGFR		•	hlgG1-Fc		4	•	•		•	•	
10	EpCAM		•	hlgG1-Fc		4	•	•		•	•	
11	JNK2		•		•	3	•	•		•	•	
12	HCV - E2dHTG		•			1	•			•		
13	HCV - E2dHTG		•	hlgG1-Fc		1	•			•		
14	HCV - E2dTG		•			1	•			•		
15	HCV - E2dTG		•	hlgG1-Fc		1	•			•		
16	HER2		•	hlgG1-Fc		4	•	•		•	•	
17	HER3		•	hlgG1-Fc		4	•	•		•	•	
18	huTNFR-1		•	hlgG1-Fc		4	•	•	•	•	•	
19	huTNFR-2		•	hlgG1-Fc		4	•	•	•	•	•	
20	Lysozym		•		(•)	2	•	•		•		
21	moTNFR-1		•	hlgG1-Fc		4	•	•		•	•	
22	moTNFR-2		•	hlgG1-Fc		4	•	•		•	•	
23	MUC1	•			•	3	•			•		
24	RNAse 1		•			3	•	•		•	•	
25	RNAse 4		•			3	•	•		•	•	
26	RNAse 5		•			3	•	•		•	•	
27	RNAse 7		•			3	•	•		•	•	
28	TAU pep 1	•				2	•	•		•	•	
29	TAU pep 2	•				2	•	•		•	•	
30	TAU pep 3	•				2	•	•		•	•	
31	TGFBR2		•	hlgG1-Fc		2	•			•		
32	"Protein" I		•		•	3	•	•		•	•	
33	"Protein" II		•		•	3	•	•		•	•	
34	"Protein" III		•		•	4	•	•		•	•	
35	Lin7c	•			•	1		•		•		
36	UB2D1	•			•	1		•		•		
37*	INADL-1	•			•	1		•		•		
38*	TX1B3	•			•	1		•		•		
39*	UCHL3	•			•	3	•			•	•	
40*	BIRC3	•			•	3	•			•	•	

#	Antigen	Peptid	Protein	Tag	Biotin	Anzahl der Pannings	MTP	Bead	Immunotube	lösliche scFab Screening	Phagen Screening	Binder
41*	UEVLD-I	.	.		.	3	.			.	.	
42*	ZO3	.	.		.	3	.			.	.	
43*	UBE25-I	.	.		.	3	.			.	.	
44*	BIRC2	.	.		.	3	.			.	.	
45*	UBP8	.	.		.	3	.			.	.	
46*	UBE2a	.	.		.	3	.			.	.	
47*	TOPB1-h003	.	.		.	3	.			.	.	
48*	TP53B-1-h006	.	.		.	3	.			.	.	
49*	TX1B3-h002	.	.		.	3	.			.	.	
50*	UBC9-h004	.	.		.	3	.			.	.	
51*	UBE2C-h003	.	.		.	3	.			.	.	
52*	UCHL5-1-h003	.	.		.	3	.			.	.	
53*	UHRF1-h005	.	.		.	3	.			.	.	
54*	XRCC1-h009	.	.		.	3	.			.	.	
55*	ZBT32-h002	.	.		.	3	.			.	.	
56*	"Peptid" I	.	.		.	3	.			.	.	
57*	"Peptid" II	.	.		.	3	.			.	.	
58*	"Peptid" III	.	.		.	3	.			.	.	
59*	"Peptid" IV	.	.		.	3	.			.	.	
60*	"Peptid" V	.	.		.	3	.			.	.	
61*	"Peptid" VI	.	.		.	3	.			.	.	
62*	Lysozym	.	.		.	3	.			.	.	
63*	Streptavidin	.	.		.	3	.			.	.	
64*	BSA	.	.		.	3	.			.	.	
65*	Adalimumab	.	.		.	3	.			.	.	
66*	Infliximab	.	.		.	3	.			.	.	
Total	66	34	32	18	41	198	62	32	2	66	49	0

Proteine und Peptide in „“ dürfen aus Gründen der Geheimhaltung nicht genannt werden

Gegen keines der in Tabelle 4-3 gelisteten Antigene war es unter den gewählten Bedingungen möglich Antikörper mit Hilfe der $\sim 1 \times 10^{10}$ großen naiven scFab Bibliothek zu generieren. Es wurden unterschiedliche Strategien zur Antikörperselektion gewählt. So wurden Antigene in biotinylierter und nicht biotinylierter Form zur Antikörperselektion verwendet. Pannings sowohl auf Beads als auch auf Mikrotiterplatten waren dadurch möglich. Zudem wurde bei einigen Antigenen ein Panningprotokoll mit dem *E. coli* Stamm TG1 gewählt, welches im Vergleich zum herkömmlichen Selektionsprotokoll mit XL1-Blue MRF' in diesen Fällen keine Vorteile brachte. Das für scFv standardisierte Protokoll sieht das Immobilisieren von 1 µg Antigen in der ersten Selektionsrunde vor. Dieser Parameter wurde variiert, sodass Antigenmengen von 500 ng bis 15 µg verwendet wurden. Auch die Durchführung von zwei bzw. vier Selektionsrunden führte nicht dazu, dass die Anreicherung von spezifischen Antikörperphagen beeinflusst werden konnte. Darüber hinaus wurden das Screening mit löslichen Antikörperfragmenten und mit Phagenpartikeln durchgeführt. Keine Veränderung der Parameter führte zu einer erfolgreichen Antikörperselektion.

4.6 Untersuchung von Parametern des Selektionsprozesses

Mit den zuvor beschriebenen Parametern war es nicht möglich Antikörper gegen eines der in Tabelle 4-3 gelisteten Antigene zu generieren. In Abbildung 31 ist die Antikörper Ausbeute einer parallel generierten scFv Bibliothek (HAL9 und HAL10) dargestellt, welche auf Basis der selben Spender generiert wurde. Es wurde die Anzahl der durchgeführten Pannings untersucht und in Korrelation zu den selektierten Antikörperfragmenten gebracht (Abbildung 31).

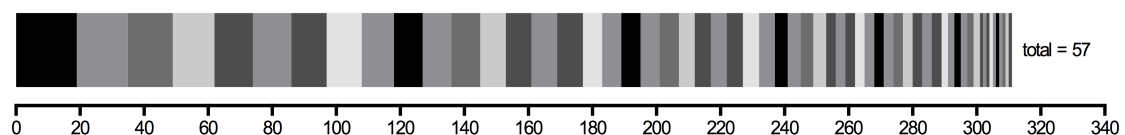


Abbildung 31: Anzahl der selektierten Antikörper mit der Antikörperbibliothek HAL9/10 gegen 57 Antigene (persönliche Kommunikation PD Dr. Michael Hust, Stand Juli 2014).

Dargestellt ist die Menge an generierten Antikörpern insgesamt sowie die Anzahl an scFvs pro Antikörperselektion. Total wurden mit der genannten scFv-Bibliothek 57 Pannings durchgeführt, in denen über 300 spezifische Antikörperfragmente generiert werden konnten. Die Zahl an generierten Antikörpern pro Antigen und Selektion liegt zwischen 19 und 1.

4.6.1 Automatisierung

Um etwaige Fehler bei der Durchführung des Pannings auszuschließen, wurde die automatisierte Antikörperselektion auf Beads mittels KingFisher etabliert. Zur Antikörpergenerierung wurden die scFv-Bibliotheken HAL7/8 sowie die in dieser Arbeit

generierte scFab Bibliotheken HAL11/12 eingesetzt. Antigene waren die vier Peptide Lin7c, UB2D1, INADL-1 und TX1B3. Nach drei Selektionsrunden wurden je 92 Klone im ELISA untersucht. Die Anzahl an ELISA-Signalen im Screening, die signifikant über dem des Hintergrundes lagen, sind unten dargestellt (Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4: Ergebnisse der automatisierten Antikörperselektionen gegen vier Antigene mit den Bibliotheken HAL7/8 und HAL11/12

Antigen	Bibliothek	
	HAL7/8	HAL11/12
Lin7c	17	0
UB2D1	78	0
INADL-1	0	0
TX1B3	34	0

Für Lin7c gaben 17 scFvs der 92 getesteten Klone im Screening ein signifikant höheres Signal auf dem Antigen als auf der Kontrolle. Bei UB2D1 waren es 78 und bei TX1B3 34 Klone. Für INADL-1 konnten keine spezifisch bindenden scFv Antikörperfragmente generiert werden.

Eine Antikörperselektion mit Hilfe der scFab Bibliothek unter den gleichen Bedingungen war nicht möglich.

4.6.2 Elution von scFab Antikörperphagen

Eine erfolgreiche Antikörperselektion mittels Phagendisplay erfordert ein effizientes Eluieren der bindenden Phagen vom Antigen. Für das Antikörperphagen des pHAL Vektorsystems wurde die Elution durch Trypsin etabliert¹³¹. Weitere Methoden wurden untersucht und sind in Abbildung 32 zusammengefasst.

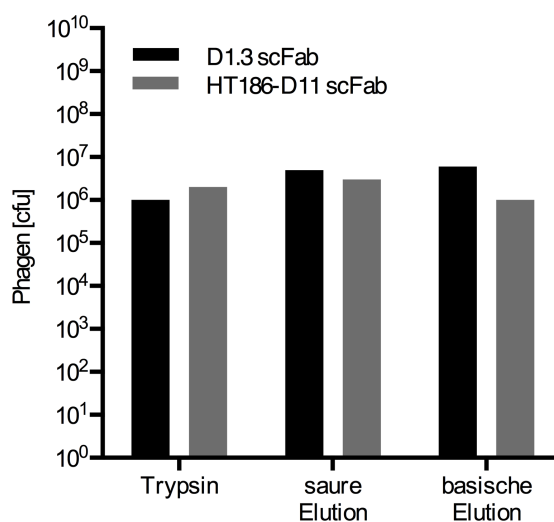


Abbildung 32: Vergleich verschiedener Elutionsmethoden von Phagen. 1×10^9 spezifische Phagen wurden verwendet und auf 100 ng/Kavität Antigen inkubiert. Die Elution erfolgte über Trypsin, HCl/Glycin und TAE. Die cfu wurde durch einen Phageninfektionstest bestimmt.

Die Verwendung von unterschiedlichen Methoden führte in allen Fällen zur Elution von Phagen. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede der drei Elutionsmethoden (Trypsin, basisch oder sauer) feststellen. Bei 10^9 eingesetzten Phagen konnten in allen Fällen etwa 10^6 Phagen eluiert werden.

4.6.3 Variation von Helferphagen in der scFab Antikörperselektion

Das Verwenden des Hyperphagen bei der Phagenverpackung führt zu einem polyvalenten Display von Antikörperfragmenten auf Phagen bei der Verwendung von Phagemiden. Für das scFv-Format etabliert, ist die Verwendung der Hyperphage für die initiale Verpackung der Bibliothek und der im Weiteren genutzte Helferphage M13K07 in den drei Selektionsrunden etabliert. Analysen der nicht erfolgreichen Antikörperselektionen mit HAL11/12 ergaben, dass in Runde zwei und drei vermehrt Antikörperphagen mit unvollständigen Antikörper-fragmenten selektiert werden (Daten nicht gezeigt). Es sollte untersucht werden welchen Einfluss das Verwenden der Hyperphage in den Selektionsrunden hat. Abbildung 33 veranschaulicht den experimentellen Aufbau eines Pannings gegen CD33.

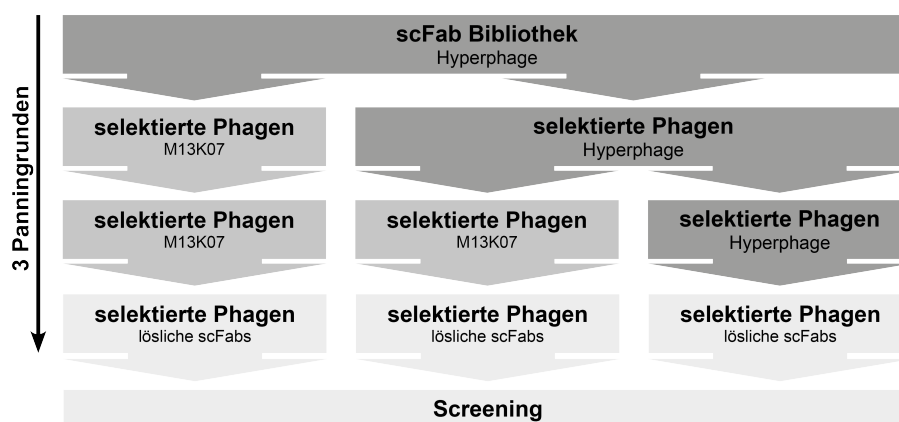


Abbildung 33: Schematische Darstellung der verwendeten Helferphage in den Selektionsrunden.

Das Verwenden von M13K07 und Hyperphage in der Selektion und das daraus resultierende poly- oder monovalente Display von Antikörperfragmenten führte nicht dazu, dass sich die Anzahl an vollständigen Fragmenten signifikant veränderte (Daten nicht gezeigt).

4.6.4 Spicken der Bibliothek

Es wurden zur Selektion von Antikörperfragmenten pro Antigen etwa 5×10^{11} Phagen eingesetzt. Statistisch bedeutete dies, dass bei einer Diversität von $\sim 10^{10}$ jeder Antikörperklon 50-fach vertreten war.

Es sollte untersucht werden, wie hoch die Menge an spezifisch bindenden Phagen sein muss, um diese nach dem Selektionsprozess im ELISA zu detektieren. Antikörperphagen die spezifisch an die Antigene MUC1, JNK2 und Lysozym binden (Daten nicht gezeigt), wurden in verschiedenen Mengen zur Bibliothek gegeben und es wurde ein Panning über drei Runden durchgeführt. Es folgte ein ELISA-basiertes Screening von 92 Klonen.

Tabelle 4-5 ist die Anzahl an Klonen, die sich im ELISA auf dem entsprechenden Antigen signifikant vom Hintergrund unterschieden, dargestellt. Getestet wurden in jedem Ansatz 92 Klone.

Tabelle 4-5: Übersicht der selektierten Binder aus gespickten scFab-Bibliotheken nach drei Selektionsrunden

Antigene	gespickten Phagen [pfu]	
	10^4	10^2
MUC1 (32mer)	0	0
JNK2	2	0
Lysozym	0	7

Das Hinzugeben spezifischer MUC1 und JNK2 Phagen zur Bibliothek führte nicht dazu, dass nach drei Runden Antigen bindende scFabs selektiert werden konnten. Anders war es bei JNK2 und Lysozym zu beobachten. Hier konnten bei der Zugabe von 10^4 Phagen zum Panning gegen JNK2 zwei Binder, bei der Zugabe von 10^2 Phagen zum Lysozym Panning sieben Binder im ELISA detektiert werden. Analysen durch Sequenzierung ergaben, dass es sich nicht um die hinzugegebenen Klone handelte und keine vollständigen scFabs selektiert worden sind.

4.6.5 Delta N1 und N2

Um den Einfluss der N1 und N2 Domäne im gIII des Phagen im Antikörperphagendisplay zu überprüfen, wurden weitere Bibliotheken generiert. Die Plasmid DNA der scFab-Bibliotheken HAL11/12 wurde isoliert und anschließend durch Restriktionsendonukleasen verdaut. Die daraus resultierenden Fragmente, bestehend aus der leichten und schweren Kette sowie dem Linker, wurde anschließend in die Vektoren pHAL22 (Δ N1), pHAL23 (Δ N2) und pHAL24 (Δ N1+N2) kloniert. Die Transformation erfolgte in elektrokompente ER2738 Zellen (Lucigen). Kappa und Lambda sowie die unterschiedlichen Δ N1/N2/N1+N2 Bibliotheken wurden getrennt voneinander generiert und gelagert. In Abbildung 34 sind die Resultate der Einzeltransformationen und die Diversitäten von Kappa und Lambda für pHAL22, pHAL23 und pHAL24 dargestellt.

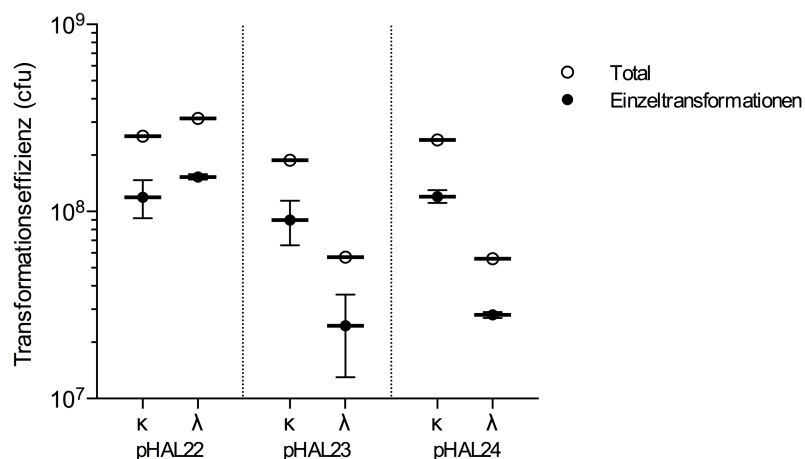


Abbildung 34: Diversität der generierten scFab-Antikörpergenbibliotheken auf Basis des pHAL22, pHAL23 und pHAL24 aufgeteilt in Kappa und Lambda und Transformationsraten der Einzeltransformationen.

Wie Abbildung 34 veranschaulicht, wurden sechs Bibliotheken generiert. Die Transformationseffizienzen der Einzeltransformationen lagen im Bereich von 10^7 cfu und 10^8 cfu. Die Diversität aller Bibliotheken lag im Bereich von $2-3 \times 10^8$ (außer pHAL 23 Lambda und pHAL24 Lambda = 8×10^7). Die Verpackung der Antikörperbibliotheken erfolgte mit Hilfe des Helferphagen M13K07 (Daten nicht gezeigt).

Die Bibliotheken wurden im Folgenden zu gleichen Teilen für die Antikörperphagenselektion gegen die Antigene 37-66 (Tabelle 4-3) verwendet. Die Anreicherung von spezifischen Phagen wurde durch einen ELISA mit Antikörperphagen untersucht. Verpackte Phagen jeder Runde wurden verwendet (Abbildung 35).

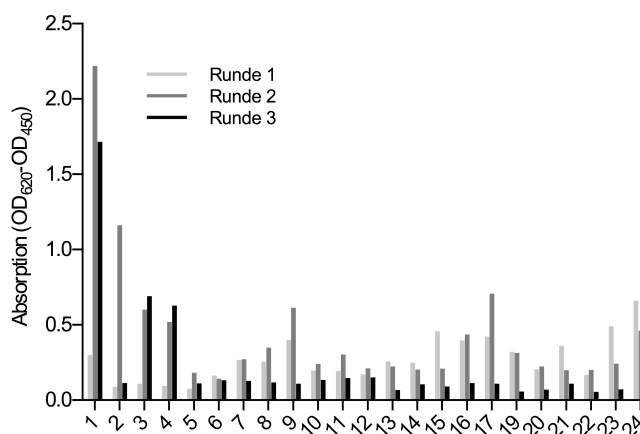


Abbildung 35: Ergebnisse polyklonaler Phagen ELISA aller drei Selektionsrunden. 100 µL Phagenüberstand wurde nach den Selektionsrunden zur Inkubation auf 100 ng/Kavität Antigen verwendet. Der Nachweis erfolgte über einen Maus α-pVIII HRP-konjugierten Antikörper und TMB-Substrat.

Es wurden drei Selektionsrunden gegen unterschiedliche Antigene durchgeführt. Für keines der Antigene war es möglich spezifische Binder zu selektieren. Auffällig war, dass nach

Runde eins und Runde zwei steigende Signale im ELISA detektiert wurden, in Runde drei nur ELISA-Signale im Bereich des Hintergrundes gemessen wurden. Diese Beobachtung konnte für alle Antigene gezeigt werden.

4.7 Untersuchung von Parametern der Phagenverpackung

Die Möglichkeit hohe Phagentiter bei der Verpackung zu erzielen, ist wichtig, um die Diversität einer großen Bibliothek vollkommen abzudecken. Im Folgenden wird auf den Einfluss des Antikörperformats auf die Verpackung eingegangen.

4.7.1 Helferphagen

Die Modelantikörper HT186-D11 und D1.3 sollten in ihrer Eigenschaft zur Verpackung in den Formaten scFv und scFab verglichen werden. Hierbei wurde zur Verpackung sowohl der Helferphage M13K07 als auch der Hyperphage verwendet. Getitert wurde durch einen *E. coli* Infektionstest (Abbildung 36).

Die Titer der verpackten Modellantikörper reichten von $\sim 10^{11}$ pfu/mL bis 10^{14} pfu/mL. Bei der Verpackung des Antikörperfragmentes HT186-D11 hatte der scFab (Hyperphage) den kleinsten Titer (10^{11} pfu/mL), gefolgt von den scFv mit 10^{12} pfu/mL (scFv und scFab) und dem Hyperphagen verpackten scFab mit 3×10^{13} pfu/mL.

Die Titer des Fragments D1.3 (außer scFab/Hyperphage) lagen im Bereich von 10^{14} pfu/mL, für den D1.3 scFab Phagen (Hyperphage) wurde ein Titer von 10^{12} pfu/mL ermittelt.

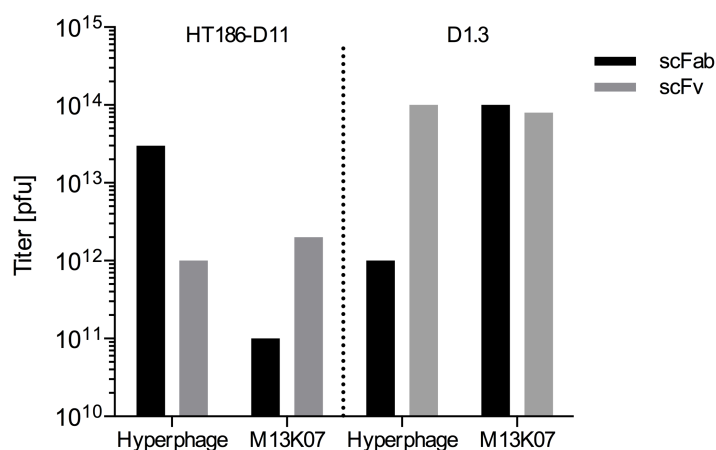


Abbildung 36: Übersicht produzierter Antikörperphagen der Klone HT186-D11 und D1.3 mit den Helferphagen M13K07 und Hyperphage.

Um zu überprüfen, welchen Einfluss der Bakterientiter in der Phagenproduktion hat, wurden Zeitreihen angefertigt. Hierfür wurde die Phagenproduktion im 600 mL Maßstab von sechs Lambda scFab Subbibliotheken überprüft. Stündlich wurden Proben entnommen, um den Bakterien- und Phagentiter zu bestimmen. Die Bestimmung der Bakterienmenge erfolgte

Ergebnisse

fotometrisch. Zur Bestimmung der Phagenkonzentration wurde ein *E. coli* Infektionstest durchgeführt.

Es wurden 200 mL Medium mit Bakterien der Subbibliothek auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Bei OD₆₀₀ = 0,5 wurde die Verpackung der Subbibliotheken durch die Zugabe von Hyperphage initiiert. Anschließend wurde das Volumen auf 600 mL pro Ansatz erhöht. Fünf Stunden nach diesem Zeitpunkt wurde die erste Probe entnommen (Abbildung 37).

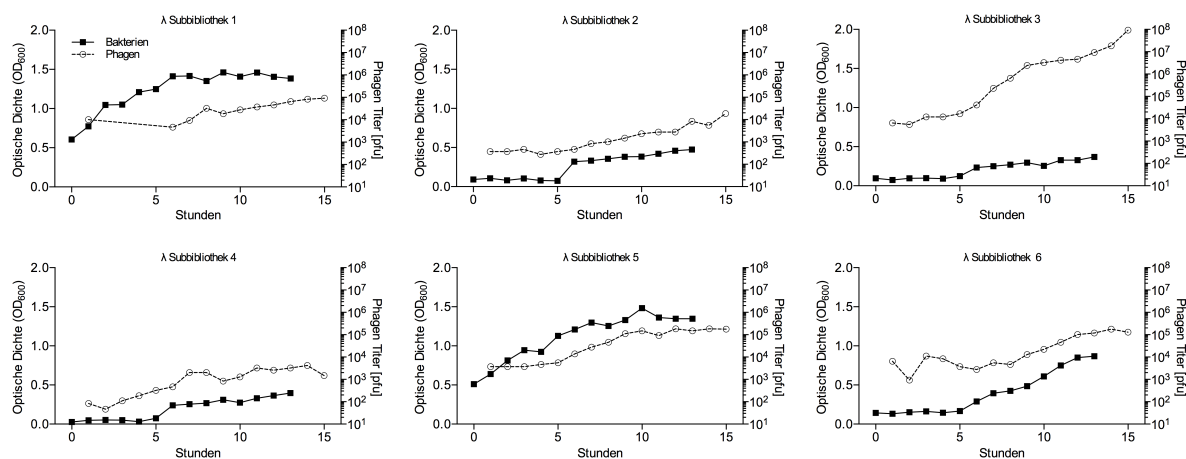


Abbildung 37: Abhängigkeiten der Bakteriendichte zur Menge der produzierten Phagen. Die Bestimmung der Bakterienmenge erfolgte fotometrisch. Die Menge der Phagen im Überstand wurde durch einen Phageninfektionstest ermittelt. Dargestellt ist eine Übersicht der Verpackung von sechs Lambda Subbibliotheken über 15 Stunden.

Die ermittelten Bakterientiter unterschieden sich zu Beginn stark voneinander. Für Bibliothek 1 und 5 konnte eine OD₆₀₀ von ~0,5 ermittelt werden. Alle anderen Kulturen im Vergleich lagen bei ~0,1. Des Weiteren konnten Unterschiede im Bakterienwachstum beobachtet werden. Die Bibliotheken 2, 3 und 4 erreichten bei einem Wachstum über 15 Stunden eine OD₆₀₀ von 0,5. Bibliotheken 1 und 5 hatten eine OD₆₀₀ von 1,5, wobei nach ca. 5 Stunden in beiden Fällen ein Plateau erreicht wurde. Für Bibliothek 1 konnte nach 20 Stunden Wachstum eine OD₆₀₀ von ~1,0 ermittelt werden. Für die Bibliotheken 1, 2, 4, 5 und 6 konnte nach 20 Stunden Phagen Produktion ein Titer von 10⁵ pfu/mL gemessen werden. Subbibliothek 3 hatte nach 20 Stunden Produktion einen Titer von 10⁸ pfu/mL.

4.7.2 Temperatur

Es war zu beobachten, dass die Voll-Längen Insert-Rate der untersuchten Antikörperphagen während des Selektionsprozesses über drei Runden kontinuierlich abnahm. Der Einfluss der Inkubationstemperatur nach den Selektionsrunden sollte überprüft werden. Etabliert ist hier eine Temperatur von 37 °C für scFv Bibliotheken.

Es wurde eine Selektionsrunde mit verschiedenen Antigenen durchgeführt. Nach erfolgreicher Infektion einer *E. coli* XL1-Blue MRF' Kultur durch Phagen, wurden die Bakterien geteilt und über Nacht bei 30 °C und 37 °C in Flüssigmedium kultiviert, anschließend ausplattiert und per PCR die Voll-Längen Insert-Rate der selektierten Klone überprüft (Abbildung 38).

Die Voll-Längen Insert-Rate der Antikörperfragmente kultiviert bei 30 °C und bei 37 °C unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Insert-Raten lagen im Bereich zwischen 60 % und 80 %.

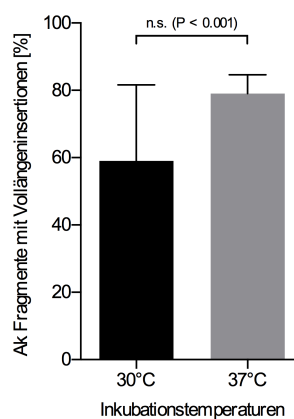


Abbildung 38: Vergleich der Anzahl an scFab Fragmenten mit Voll-Längen Insert-Raten bei den Inkubationstemperaturen 30 °C und 37 °C. Die erfolgte Bestimmung durch Kolonie PCR.

4.8 Selektion von spezifischen Antikörperphagen mittel ELISA

Die Auswahl der Antikörperfragmente, die nach den Selektionsrunden ihr Antigen spezifisch binden, erfolgte mittels ELISA. Das Antigen und eine Negativkontrolle, standardmäßig BSA, wurde immobilisiert und Einzelklone entweder als Antikörperphage oder als lösliches Antikörperfragment wurden produziert und die Bindung untersucht. Klone deren ELISA Signale auf dem Antigen signifikant höher waren als auf der Negativkontrolle wurden für weitere Analysen ausgewählt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Produktion von löslichen Antikörperfragmenten und Antikörperphagen sowie alternative Nachweismethoden zur standardisierten HRP-Reaktion im ELISA haben.

4.8.1 Produktion

Die Signalstärke im ELISA wird vom immobilisierten Antigen und von dem eingesetzten Antikörper beeinflusst. Bei höheren Konzentrationen des eingesetzten Antikörperfragments sind in der Regel höhere Signale zu messen.

Um die optimalen Bedingungen für das Screening von Antikörperfragmenten mittels ELISA zu schaffen, wurden Experimente zur Steigerung der scFab Produktionsmenge durchgeführt. Hier wurde der Einfluss der Produktionstemperatur, der IPTG-Konzentration, des Zeitpunkts der Induktion und der des Mediums untersucht.

Modellantikörper und zufällig gewählte Klone aus der scFab Bibliothek sowie Kontrollen aus einer etablierten scFv Bibliothek, wurden unter verschiedenen Bedingungen bakteriell exprimiert und die Überstände bzw. die periplasmatische Fraktion analysiert. Der Nachweis des produzierten Fragments erfolgte visuell durch die Auswertung angefertigter Dotblots von Produktionsüberständen (Daten nicht gezeigt).

Das Produktionsverhalten der scFv- und scFab-Fragmente unterschied sich deutlich. Die Produktion von löslichen scFv-Fragmenten war minimal abhängig vom Medium, Zeitpunkt der Induktion und von der Temperatur. Die Expression von löslichen scFabs in *E. coli* hingegen war weniger robust. Die höchsten Produktionsraten konnte unter folgenden Bedingungen erzielt werden: Induktion bei OD₆₀₀ 0,5, 500 nM IPTG, 5xYT Medium, 30 °C Produktionstemperatur.

4.8.2 Phagen ELISA

Eine Alternative zum Screening von spezifischen Antikörperfragmenten mit löslichen Antikörpern ist das Verwenden von Antikörperphagen. Der Nachweis erfolgte nicht über den Myc Tag und einen weiteren HRP-gekoppelten Antikörper, sondern über einen α -pVIII-HRP gekoppelten Antikörper. Jeder Phage trägt > 1000 pVIII auf der Oberfläche und es sollte untersucht werden, ob der Nachweis über dieses Protein Einfluss auf die Sensitivität hat.

Das nach der Antikörperselektion durchgeführte Screening einiger Antigene (siehe Tabelle 4-3) wurde mit löslichen scFabs und Antikörperphagen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dieses alternative Screening führte nicht zu der Identifikation von spezifisch bindenden Antikörperfragmenten.

4.8.3 ELISA mit dem Nachweis über Europium

Eine Alternative zu HRP und TMB ist die Verwendung eines α -Myc-Europium-Antikörpers. Der Nachweis des Europiums erfolgt fotometrisch.

Es wurde untersucht wie sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des etablierten Peroxidasessystems im Vergleich zum Nachweis über Europium verhält. Zur Analyse wurden bakteriell exprimierte scFabs auf immobilisiertem Antigen und Kontrollantigen inkubiert und die Bindung mit beiden Methoden nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Die Analysen unterschiedlicher Antikörperfragmente und derer Konzentrationen ergab ein etwa zweifach erhöhtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis des Europium basierenden Nachweissystems verglichen zum Nachweis über TMB.

Im Folgenden wurden das Screening zur spezifischen Bindung von Antikörperfragmenten einiger der in Tabelle 4-3 dargestellten Antigene mit der alternativen Methode durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis über einen Europium konjugierten α -Myc-Antikörper führte nicht zu der Identifikation von Antikörperfragmenten mit spezifischer Bindung.

4.9 Charakterisierung von scFab

Zur weiteren Analyse sollten die Modellantikörper D1.3 und HT186-D11 als scFv und scFab löslich produziert werden. Bakterielle und säugerzellbasierte Expressionen sollten hier verglichen werden sowie die Proteine biochemisch untersucht und charakterisiert werden.

4.9.1 Produktion von „model scFabs“

Zur Produktion der Modellantikörper wurden diese in die Expressionsvektoren pOPE107-XP und pCSE2.5-His kloniert, anschließend durch Sequenzierung verifiziert, produziert und gereinigt.

4.9.1.1 *E. coli* Produktion von scFv und scFab Modellantikörpern

Die bakterielle Expression der Modellantikörper erfolgte mit Hilfe des *E. coli* Stammes XL1-Blue MRF'. Die Produktion erfolgte im LEX-Bioreaktorsystem und eine Proteinreinigung mittels Nickelsepharose. Die Proteine wurden gegen PBS dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Produktionen sind im Folgenden dargestellt (Abbildung 39).

Die Produktion sowie Reinigung der Modellantikörper im LEX-Bioreaktorsystem waren in allen Fällen erfolgreich. Die Intensität der Banden für HT186-D11 scFv, D1.3 scFv und D1.3 scFab waren vergleichbar. HT186-D11 scFab hatte im SDS Gel die stärkste Bande. Im SDS Gel waren keinerlei Verunreinigungen oder Degradationen nachweisbar. In Elution II des HT186-D11 scFab wurden bei ca. 35 kDa und 25 kDa Proteine nachgewiesen.

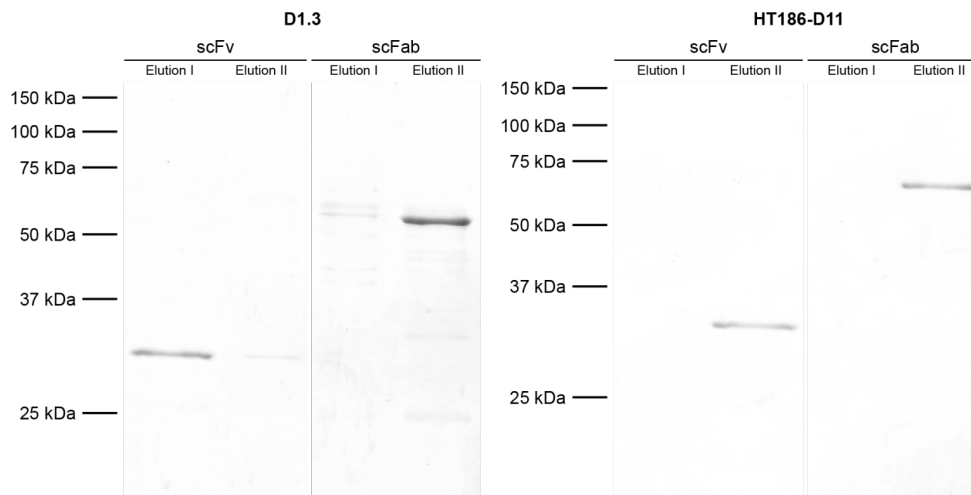


Abbildung 39: Analyse der bakteriell produzierten Antikörperklone D1.3 und HT186-D11 als scFab und scFv. SDS-PAGEs von 12 %igen SDS Gelen zum Nachweis der Produktion löslicher Antikörperfragmente. Aufgetragen sind 10 μ L der Elutionsfraktionen einer IMAC Reinigung. Der Nachweis erfolgte durch das Färben mit Coomassie-Brillant-Blau.

4.9.1.2 Säugerzellbasierte Expression

Zur weiteren Charakterisierung des scFab-Formats sollten die Modelantikörper HT186-D11 und D1.3 in HEK293-6E Zellen produziert werden. Die Antikörperfragmente wurden in den Expressionsvektor pCSE2.5-His kloniert.

Die Fragmente wurden in HEK293-6E Zellen transient exprimiert. Der Überstand wurde mit gereinigt. Das Elutionsvolumen betrug 4 mL. Die Produktionsmengen sind in Tabelle 4-6 dargestellt.

Tabelle 4-6: Übersicht der Produktionsmengen in säugerzellbasierter Apxpression von produzierten Antikörperfragmenten unter Berücksichtigung der Korrekturfaktoren

Antikörper	Format	Protein total (mg)	Produktionsausbeute (mg/L)
D1.3	scFab	1,7	8,4
	scFv	2,7	13,8
HT186-D11	scFab	0,9	4,4
	scFv	3,8	18,8

Die Produktion der Antikörperfragmente im 50 mL Maßstab ergab nach der Affinitätsreinigung über den His-tag Produktionsmengen zwischen ~0,9 mg und 3,8 mg Gesamtprotein. Die Produktionsmenge der gereinigten scFab-Antikörperfragmente lag hier zum Teil deutlich unter dem des gleichen Antikörpers im scFv-Format. Des Weiteren wurden Größe und Reinheit der gereinigten Fragmente durch SDS-PAGE (Abbildung 40) und SEC Analysen (Abbildung 41 A-D) bestimmt.

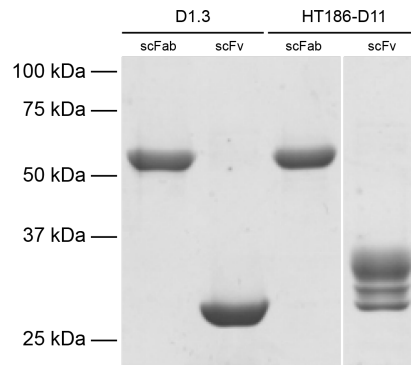


Abbildung 40: Analyse der in säugerzellbasierte Expression von den Antikörperklonen D1.3 und HT186-D11 als scFab und scFv. SDS-PAGEs von 12 %igen SDS-Gelen zum Nachweis der Produktion löslicher Antikörperfragmente. Aufgetragen sind 10 μ L der Elutionsfraktionen einer Profinia-Reinigung (His-Trap 1 mL). Der Nachweis erfolgte durch das Färben mit Coomassie-Brillant-Blau.

Der Antikörper D1.3 als scFv und als scFab Fragment sowie HT-186-D11 als scFab wurden sauber gereinigt. Das Antikörperfragment HT186-D11 scFv hatte unter reduzierenden Bedingungen mehrere Banden. Die stärkste Bande war knapp unter der Lauffhöhe der 37 kDa Bande des Markes erkennbar. Zwei weitere distinkte Banden waren unmittelbar darunter detektierbar.

Das Aggregationsverhalten der gereinigten Antikörperfragmente sollte durch preparative Größenausschlusschromatographie untersucht werden. 100 μ L gereinigter Antikörper wurden verwendet (Abbildung 41). Der Durchfluss wurde in 500 μ L fraktioniert.

Das Antikörperfragment HT186-D11 als scFab lag hauptsächlich als Monomer vor und konnte einer Größe von 47 kDa zugeordnet werden. Zu einem geringen Anteil konnte bei 112 kDa ein Dimerpeak detektiert werden. Die SEC Analysen des Antikörperklons HT186-D11 im scFv-Format ergaben zwei deutliche Peaks mit einer Größe von 33 kDa und 17 kDa, wobei der Peak mit einer Größe von 33 kDa dem Monomer entsprach und 17 kDa ein Degradations- oder Proteolyseprodukt war. Die Peakhöhe des Degradationsproduktes war deutlich höher als der Peak des Antikörpermonomers.

In der SEC konnte für den Antikörperklon D1.3 als scFab ein Monomerpeak sowie zwei weitere Peaks, die auf Aggregation hinweisen, beobachtet werden. Die Größe des Monomers entspricht 45 kDa. Auch als scFv Fragment ließ sich Aggregatbildung beobachten. Das Monomer hatte eine Größe von ca. 33 kDa.

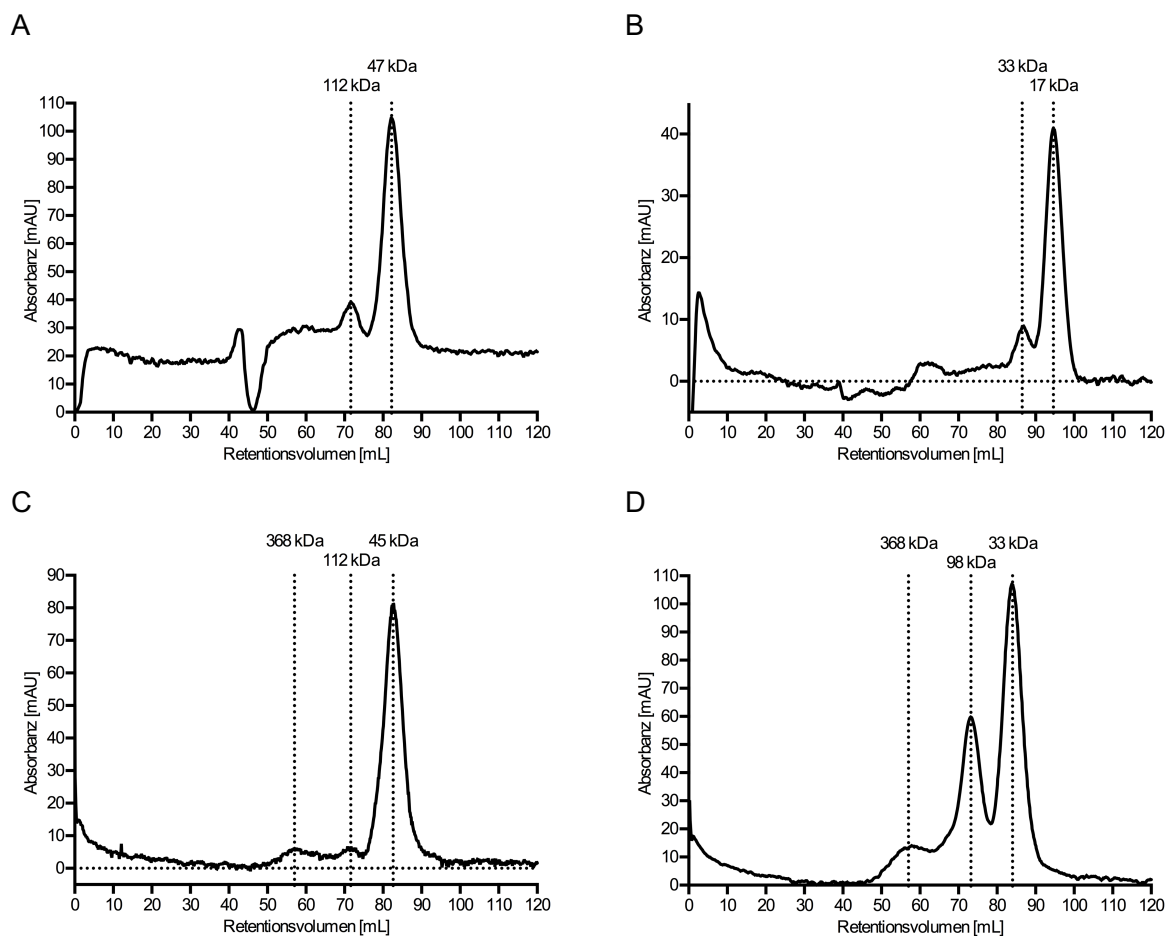


Abbildung 41: Analysen der säugerzellbasierten Expression der Antikörperklone D1.3 und HT186-D11 als scFab und scFv; Für die Größenausschluss-chromatographie der Antikörperklone wurde die Säule HiLoad16-60 Superdex200 und eine Flussrate von 0,5 mL/min verwendet; A: HT186-D11 scFab; B: HT186-D11 scFv; C: D1.3 scFab; D: D1.3 scFv.

4.9.2 Natives PAGE und Blotting

Der funktionelle Anteil der scFvs/scFabs wurde mittels nativer PAGE von D1.3 Antikörperfragmenten nachgewiesen (Abbildung 42B).

Das Biotinylieren des Antigens erfolgte durch die Verwendung des EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin Kits. Die Effizienz der Biotinylierung sowie die Funktionalität wurden durch einen ELISA untersucht. Der Nachweis zur Bindung des Antikörpers an das biotinylierte Antigen wurde durch die Zugabe von spezifischen scFv und scFab Phagen erbracht (Abbildung 42A).

Die Bindung der scFvs und scFabs ließ sich im ELISA auf dem biotinylierten Antigen nachweisen (Abbildung 42A). Zudem war der Nachweis über Streptavidin-HRP möglich.

In Abbildung 42B ist eine native PAGE sowie ein Western Blot von löslichen Antikörperfragmenten des D1.3 Antikörpers dargestellt. Links ist die Native PAGE und der Immunoblot des scFab Fragmentes zu sehen, rechts die äquivalenten Abbildungen des D1.3 scFvs. In der Coomassie Färbung des D1.3 scFab waren sowohl die Monomere als auch die

Multimere deutlich sichtbar. Ähnliches gilt für die Monomere des scFvs. Hier zeichneten sich zwei Banden ab. Da von dem D1.3 scFv keine Multimere in ausreichenden Konzentration vorlagen, wurde weniger als 1 µg aufgetragen. Lediglich eine schwache Bande war in der Färbung sichtbar. Im Immunoblot war für den D1.3 scFab bei den Monomeren nur ein sehr schwaches Signal detektierbar, bei den Multimeren ist mit dieser Nachweismethode keine Bande sichtbar. Das scFv-Fragment hingegen gab nach der Zugabe des biotinylierten Antigens (Lysozym) und der anschließenden DAB Färbung in beiden Fällen klare Signale.

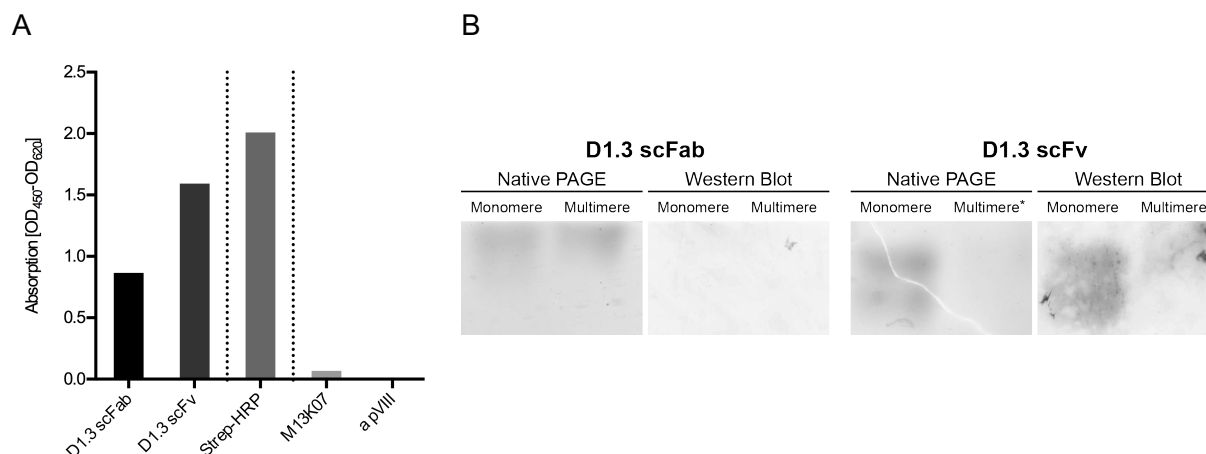


Abbildung 42: A: Ergebnisse zur Überprüfung der Funktionalität von biotinylierten Lysozym. 100ng biotinyliertes Lysozym wurde immobilisiert. Das Immobilisierte Antigen wurde mit 100 µL Phagenüberstand bzw. Streptavidin-HRP inkubiert. Der Nachweis erfolgte für die Phagen über einen Maus α-pVIII HRP-konjugierten Antikörper und TMB-Substrat für das Streptavidin-HRP nur über TMB-Substrat, M13K07 und ein Maus α-pVIII-HRP-konjugierten-Antikörper ohne vorherige Inkubation mit scFab- oder scFv-Phagenüberstand dienten zur Kontrolle; B: Analyse der bakteriell produzierten Antikörperklone D1.3 als scFab und scFv. Native Blots von 6 %igen Gelen zum Nachweis der Bindungseigenschaften löslicher Antikörperfragmente. Aufgetragen sind 1 µg Protein einer präparativen SEC. Die Gele wurden auf Nitrozellulose geblottet. Der Nachweis erfolgte durch Inkubation mit biotinylierten Lysozym und Streptavidin-HRP. Die Farbreaktion wurde durch eine DAB Färbung hervorgerufen.

4.10 Charakterisierung von scFab Phagen

Die weitere Charakterisierung des scFab-Formats umfasste zudem die Analyse von scFab Phagen. Hier wurden Experimente zur Analyse der Bindungseigenschaften und des Aggregationsverhaltens der Phagenpartikel durchgeführt.

4.10.1 Messungen zur Antigenbindung von Antikörperphagen durch SPR

Um die Bindungseigenschaft von Antikörperphagen zu testen, wurden die Antigene Lysozym und MUC1 (32mer) auf einem CM5 Chip immobilisiert. Die Messung erfolgte mit scFab und scFv Phagen in unterschiedlichen Konzentrationen. ScFv und scFab Phagen wurden in den Konzentrationen 10^9 pfu/mL, 10^8 pfu/mL und 10^7 pfu/mL getestet. Verwendet wurden Phagen die sowohl durch Hyperphage als auch durch M13K07 verpackt wurden (Abbildung 43).

Je nach Konzentration und Fragmenttyp wurden für den Antikörper D1.3 unterschiedliche *Responses* gemessen (Abbildung 43A). Aufgrund der schlechten Immobilisierung von MUC1

Ergebnisse

war es nicht möglich vergleichbare Messungen für das Antikörperfragment HT186-D11 durchzuführen.

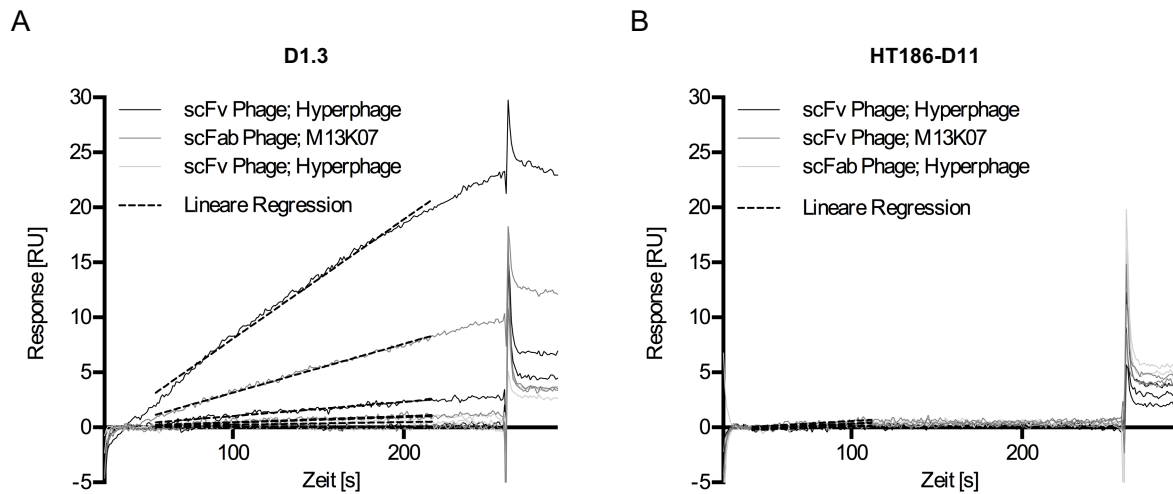


Abbildung 43: SPR Analysen zum Nachweis der spezifischen Bindung von Antikörperphagen. A: Nachweis der Bindung von D1.3 scFv- und scFab-Phagen an das an einen CM5 Chip immobilisierte Antigen Lysozym. Verwendet wurden 10^9 pfu/mL, 10^8 pfu/mL und 10^7 pfu/mL scFv- und scFab-Phagen. B: Nachweis der Bindung von HT186-D11 scFv- und scFab-Phagen an das an einen CM5 Chip immobilisierte Antigen MUC1. Verwendet wurden 10^9 pfu/mL, 10^8 pfu/mL und 10^7 pfu/mL scFv- und scFab-Phagen.

Um die verschiedenen Antikörperphagen untereinander zu vergleichen, wurde die Steigung der Kurven durch eine lineare Regressionsgerade bestimmt. Abbildung 44A und B veranschaulichen die ermittelten Steigungen. Die ermittelten Steigungen (Abbildung 44A) unterscheiden sich signifikant voneinander.

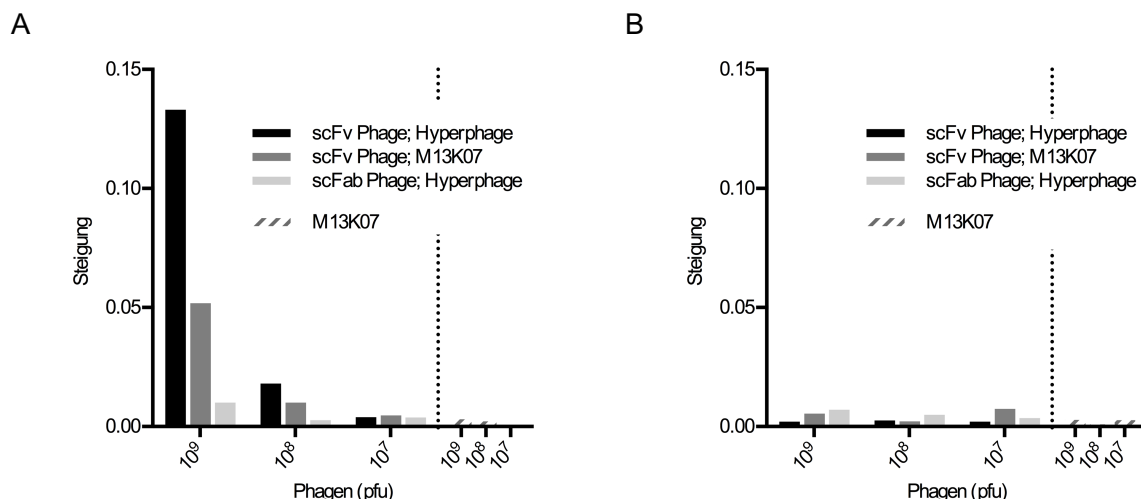


Abbildung 44: Darstellung der ermittelten Regressionen aus Abbildung 43. A: Steigung der Phagenbindung des Klonen D1.3 an das Antigen Lysozym; B: Regressionen der Phagenbindung des Klonen HT186-D11 an das Antigen MUC1.

Der höchste Wert wurde für den durch Hyperphagen verpackten scFv-Phagen in der 10^9 pfu/mL Konzentration ermittelt, gefolgt von der M13K07 verpackten scFv-Phage ebenfalls in der Konzentration 10^9 pfu/mL. Dies unterschied sich deutlich von der scFab Phage

(Hyperphage verpackt). Die Steigung bei 10^9 pfu/mL entsprach etwa der der scFv Phagen bei zehn-fach weniger eingesetzten Phagen. Bei einer Konzentration von 10^7 pfu/mL konnte in allen Fällen nahezu keine *Response* gemessen werden.

Die ermittelte *Response* für die HT186-D11 Phagen auf dem Antigen MUC1 unterschieden sich für alle untersuchten Phagen nicht voneinander (Abbildung 44B). Eine vergleichbare Tendenz wie in Abbildung 44A veranschaulicht, lässt sich in diesem Fall nicht feststellen.

4.10.2 Fluoreszenzmikroskopie

Um das Aggregationsverhalten von Antikörperphagen zu ermitteln, wurden 1×10^9 Antikörperphagen über einen FITC-konjugierten- α -pVIII Antikörper markiert und durch Fluoreszenzmikroskopie visualisiert (Abbildung 45).

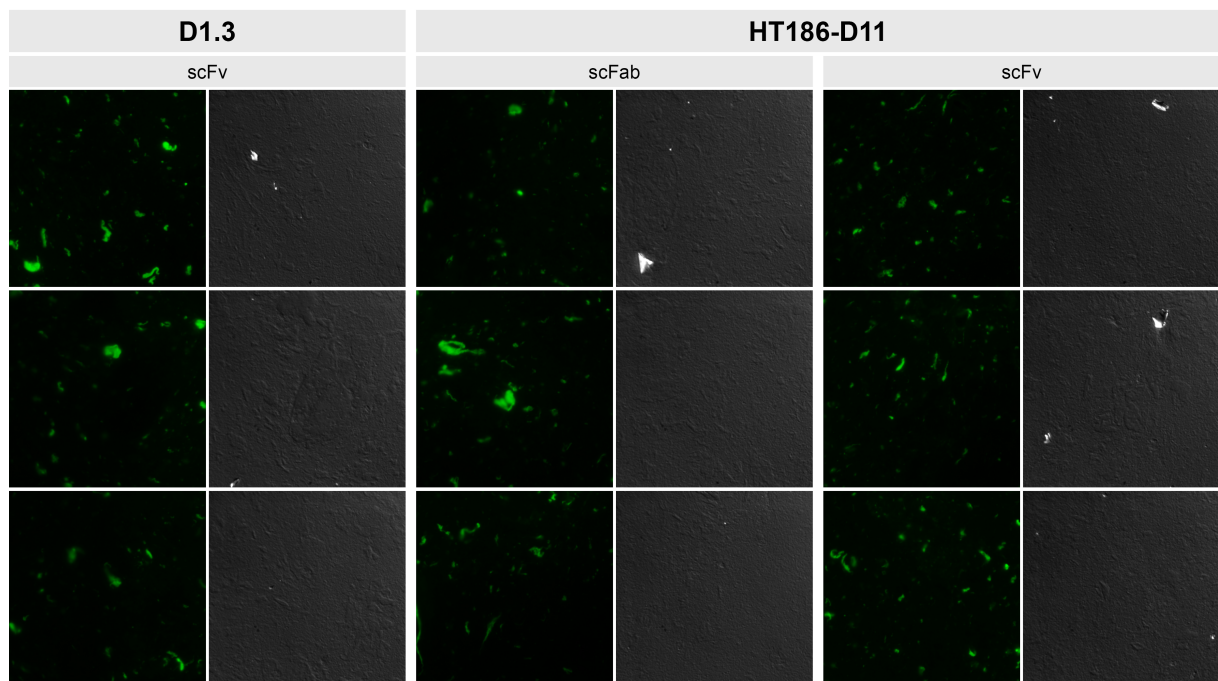


Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen von Antikörperphagen. 1×10^9 Antikörperphagen in 100 μ L PDB wurden mit einem Maus α -pVIII FITC konjugierten Antikörper für eine Stunde präinkubiert. 10 μ L der Phagenlösung wurde auf einen Objektträger getropft und mikroskopische Aufnahmen erstellt (Christian Boedeker, DSMZ Braunschweig).

In allen Fällen waren Aggregate in unterschiedlicher Größe nachweisbar. D1.3 scFv und HT186-D11 scFab bildeten die größten Aggregate, HT186-D11 die Kleinsten. Für die Antikörperphagen D1.3 scFab konnten keinerlei Aggregate detektiert werden, ebenso für die Kontrolle M13K07 (beides nicht dargestellt).

Es wurden je 100 Aufnahmen angefertigt, mit Hilfe von ImageJ analysiert und anschließend die mittlere Fragmentgröße sowie minimale und maximale Größe ermittelt. Diese wurden grafisch dargestellt (Abbildung 46).

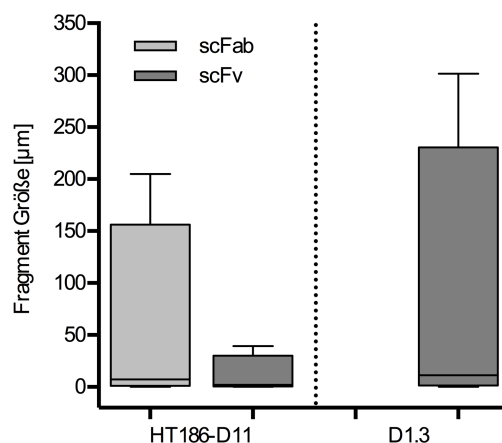


Abbildung 46: Ermittelte Fragmentgrößen spezifischer Antikörperphagen im scFv- und scFab-Format ermittelt durch Fluoreszenzmikroskopie.

Die ermittelte Partikelgröße variierte zwischen 0 und 300 µm. Für das Antikörperfragment D1.3 als scFv wurden die größten Partikel gemessen, für den HT186-D11 scFv die Kleinsten. Diese hatten eine Größe zwischen 0 und 35 µm. HT186-D11 scFab hatte Partikelgrößen im Bereich von 0 bis ~150 µm Durchmesser. Für das Antikörperfragment D1.3 scFab konnten auf keinem der 100 angefertigten Aufnahmen Fragmente visualisiert werden.

4.10.3 TEM Aufnahmen

Das Aggregationsverhalten von scFv- und scFab-Phagen sollte mittels Transmissionselektronenmikroskopie verglichen werden. Hyperphage-verpackte Antikörperphagen wurden auf einem Gitter immobilisiert und elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 47 dargestellt.

Alle in Abbildung 47 dargestellten Aufnahmen zeigten Strukturen, die auf Phagen hindeuteten. Kreisrunde Strukturen deutete auf Rückstände der Phagenfällung hin (PEG/NaCl). In den Aufnahmen konnten keinerlei Unterschiede zwischen den verschiedenen Formaten, der Library und der M13K07 Kontrolle nachgewiesen werden. Alle Phagen bildeten gitternetzartige Strukturen aus und lagen nicht einzeln vor.

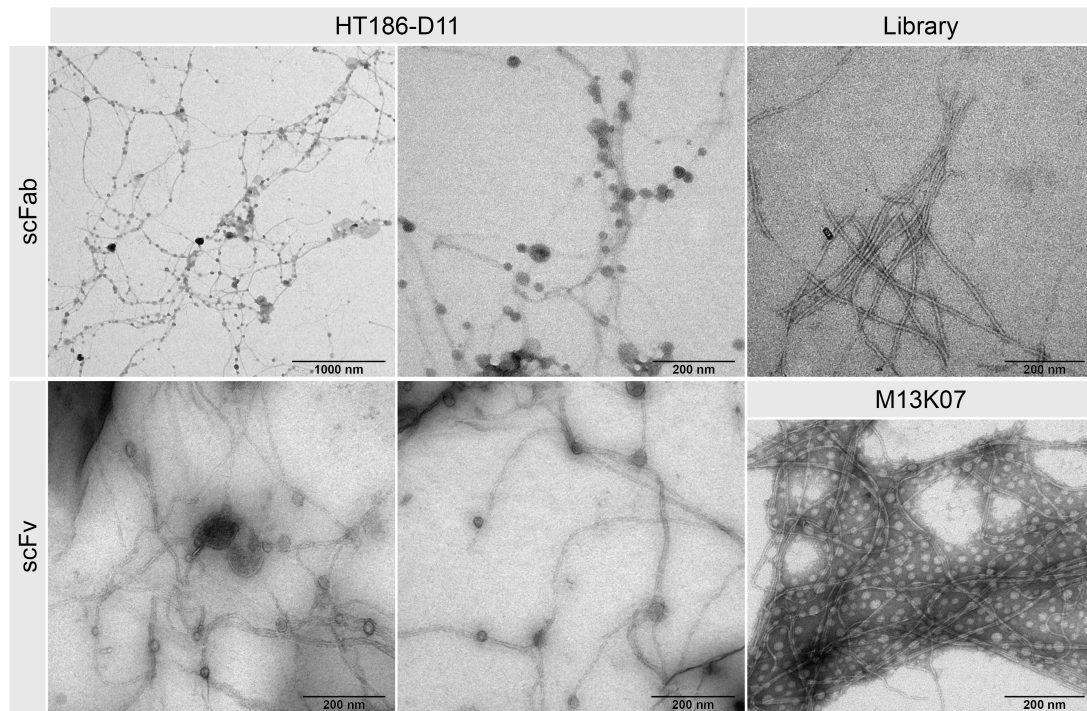


Abbildung 47: TEM Aufnahmen von Antikörperphagen im scFv und scFab-Format sowie der HAL11 scFab Antikörperbibliothek und der Kontrolle M13K07 (Dr. Rhiel, Universität Oldenburg).

5 Diskussion

Den größten Marktanteil aller produzierten Biopharmazeutika bildet die Gruppe der Antikörper und Antikörperfusionen¹⁹³. Derzeitig befinden sich viele neue Antikörper, Antikörperfragmente und Antikörperfusionsproteine in den unterschiedlichen klinischen Phasen oder warten auf Zulassung durch die zuständigen Behörden¹⁹⁴. Hohe Entwicklungskosten und strenge Zulassungsbestimmungen erfordern robuste und schnelle Selektionsmethoden für Antikörper(-fragmente). Antikörper mit humanem Ursprung, unterschiedlichen Affinitäten, bestimmten Lösungs- und Stabilitätseigenschaften sowie Bindung an unterschiedliche Antigene wie Toxine oder Oberflächenrezeptoren sind das Ziel. Die Antikörperphagendisplay-Technologie bietet verschiedene Möglichkeiten Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften zu generieren und führte dadurch in der Vergangenheit zur Zulassung einiger Antikörper aus unterschiedlichen Genbibliotheken¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Bisher wurden im Antikörperphagendisplay vorrangig die Formate scFv und Fab verwendet, obgleich sich beide Formate stark in der Produktivität unterscheiden. Beide Formate bieten allerdings die Möglichkeit auf Antikörperphagen präsentiert zu werden. Hust *et al.* (2007) demonstrierten, dass es möglich ist, durch das Verwenden eines Peptidlinkers leichte und schwere Kette des Fab Fragments zu verknüpfen. Es entstand ein single chain Fab Fragment (scFab). Die Produktion dieser Fragmente war in löslicher Form sowohl in Prokaryoten also auch Eukaryoten möglich^{186,197}. Zudem wurde durch Fusion des scFabs zum pIII Phagenprotein das erfolgreiche Verpacken von Antikörperphagen demonstriert.¹⁸⁶ Darüber hinaus ermöglicht die Fusion des scFabs an den Fc Teil die Expression von scIgGs Säugerzellkultur¹⁹⁸.

Das Format des scFab soll die Eigenschaften der beiden Formate scFv und Fab vereinigen. ScFvs neigen zu Multimerisierung und haben eine geringere Stabilität verglichen zu Fab-Fragmenten¹⁹⁹⁻²⁰². Das Fab Fragment liegt hauptsächlich als Monomer vor und neigt weniger zu Aggregation^{202,203}. Schwere und leichte Kette von Fabs sind getrennt voneinander kodiert und bei der Expression wird das vollständige Protein durch die Verknüpfung beider Ketten durch eine Disulfidbrücke generiert. Das korrekte Falten und das Erzeugen von Disulfidbrücken in *E. coli*, dem verwendeten Produktionsorganismus beim Phagendisplay, ist jedoch problematisch²⁰⁴. Hust *et al.* (2007) nahmen an, dass das scFab Fragment die positiven Eigenschaften beider Formate vereinigen kann¹⁸⁶.

Antikörperbibliotheken unterscheiden sich im Ursprung des genetischen Materials: Es wird zwischen synthetischen¹⁷⁷, semi-synthetischen¹⁴¹ und naiven^{152,155} Bibliotheken unterschieden. Naive Bibliotheken unterscheiden sich in Diversität und zudem in dem Verhältnis bzw. Vorkommen der enthaltenen Keimbahngene^{131,156,177}.

Das Ziel dieser Arbeit war die Generierung einer humanen naiven Antikörpergenbibliothek mit einer Diversität von 10^{10} auf Basis des scFab Fragments.

5.1 Vorarbeiten zur Generierung einer naiven scFab-Bibliothek

5.1.1 Design des Antikörperphagendisplayvektors

Der für die Generierung der scFab-Bibliotheken verwendeten Vektoren basieren auf dem Phagemiden pSEX71^{98,205} der durch Optimierungen bezüglich Kettenorientierungen, Linker und *tags* die pHAL-Vektorserie hervorbrachte^{186,206,207}. Verwendet wurden die Vektoren pHAL38/43. Die Präsentation von scFab-Antikörperfragmenten auf Phagen sowie die Produktion und Reinigung von löslichen Antikörperfragmenten mit diesen Vektoren wurde für definierte Modellklone in *E. coli*, *Pichia pastoris* und *Bacillus megaterium* beschrieben^{186,197}. Die Expression von Antikörpern wird von der Wahl der Codons beeinflusst²⁰⁸. Allerdings führten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Optimierungen der *codon usage* für *E. coli*, unter den beschriebenen Bedingungen nicht zu erhöhter Expression oder zu einer Erhöhung der Displayrate auf Phagen. Ansätze zur Optimierung der *Codon usage* für *E. coli* für ganze synthetische Bibliotheken wurden in der Vergangenheit durchgeführt und führte hier zu verbesserter Phagenproduktion, Displayrate oder Expression löslicher Fragmente^{177,209,210}. Darüber hinaus sind eine Vielzahl zum pHAL38 kompatible Säugerzellkultur-Vektoren verfügbar^{131,211}, bei denen nicht auszuschließen ist, dass nach der Umklonierung die Expression dann auf Grund der verwendeten für *E. coli* optimierten Sequenz beeinträchtigt werden könnte^{212,213}.

Der pHAL38/43 bietet durch die Verwendung eines Amber Stopp Codons zwischen Antikörperfragment und gIII die Möglichkeit, nach Bedarf entweder lösliche Antikörperfragmente oder gIII Fusionsproteine zu exprimieren¹⁸⁶. Das Screening löslicher Antikörperfragmente kann daher ohne Klonierungsschritt durchgeführt werden und unterscheidet sich dadurch von anderen Systemen^{112,144}.

5.1.2 Sammeln von Spendermaterial und Isolation von relevanten Genen

Deletionen, Insertionen oder Duplikationen in Genen können zu Strukturvarianten im Genom führen. Diese spontanen Variationen haben zu einem breiten Spektrum an Sequenzvariationen innerhalb der menschlichen Spezies geführt^{214,215}. Dies führte in den für Antikörper kodierenden Bereichen im menschlichen Genom zu unterschiedlichsten Varianten.

Die Größe des IGH Locus beträgt in etwa eine Megabase, befindet sich auf dem 14. Chromosom und umfasst zwischen 123 und 129 variable Gene (IGHV). Die D-Region

beinhaltet 27 Gene (IGHD), der J-Teil 9 (IGHJ) und der konstante Teil 5-11 Gene (IGHC). Duplikationen und Deletionen machen den IGH Locus zu einem der diversesten im menschlichen Genom. Die Folge ist, dass einem gesunden Menschen einige Subklassen fehlen können^{27,216,217}.

Um eine hohe Diversität der Antikörpergenbibliothek zu erreichen wurde die naive scFab Bibliotheken auf der Grundlage von 96 nicht immunisierten, gesunden Donoren konstruiert. Lymphozyten wurden aus peripherem Blut isoliert und cDNA generiert. Diese große Anzahl an Spendern sowie deren Herkunft (Europa/Amerika, Asien, Indien, etc.) verspricht die theoretisch mögliche Vielfalt der Keimbahnen und Subklassen abzudecken. Die Möglichkeit spezifische Binder aus Bibliotheken mit sogar kleineren Spendergruppen zu isolieren, ist in der Literatur beschrieben^{112,144,218}. Die Frage welchen Einfluss Patienten mit Autoimmunerkrankungen auf die Diversität und Qualität der Bibliothek haben, konnte nicht untersucht werden, da zum Zeitpunkt der Generierung kein Spendermaterial vorlag. Diese Option gilt aber als vielversprechend¹⁴⁴.

Um die genetische Diversität der Donoren zu erhalten, wurden verschiedene Methoden zur Generierung von Bibliotheken etabliert. Antikörpergenbibliotheken werden durch Ein-Schritt, Zwei-Schritt oder Drei-Schritt Klonierungen generiert. Unterschieden wird darin, ob leichte und schwere Kette gemeinsam, vorher kombiniert durch *Assembly-PCR*, getrennt voneinander oder sogar Subtypen-separiert in den Phagemiden kloniert werden^{110,112,131,153,161,219-221}. Ein-Schritt-Klonierungsstrategien haben durch die Methodik den Nachteil, nur bedingt die abgedeckte Diversität während der Klonierung überprüfen zu können. ScFv-Bibliotheken auf Basis der pHAL Vektorserie konnten in der Vergangenheit erfolgreich durch Zwei-Schritt-Klonierungen generiert werden^{131,222,223} und für die Generierung der scFab-Bibliothek wurde aus diesem Grund diese Methode gewählt.

5.1.3 Generierung von zwei scFab-Testbibliotheken und Analysen

Die Tauglichkeit des scFab-Formats, insbesondere in den Phagemiden pHAL38 und pHAL43 sollte untersucht werden und Testbibliotheken wurden mit Hilfe des *E. coli* Stamm XL1-Blue MRF' generiert. Dieser Stamm wurde bereits mehrfach erfolgreich für die Generierung von naiven- oder Immunbibliotheken verwendet^{131,222-224}. Die Diversitäten der generierten Bibliotheken lagen für die pHAL38 Bibliothek im Bereich von 5×10^7 und für pHAL43 bei 8×10^7 . Antikörperphagenselektionen mit Bibliotheken dieser Größenordnung haben in der Vergangenheit ausgereicht, spezifische Binder im subnanomolaren Bereich zu generieren^{225,226}. Verschiedene Parameter der Vektoren pHAL38 (nicht Codon optimiert) und pHAL43 (Codon Optimierung der VH für *E. coli*) sollten verglichen werden um den Vektor mit den besten Eigenschaften zur Erstellung einer großen komplexen Bibliothek zu identifizieren. Transformationseffizienzen, Insert-Raten, Phagentiter sowie Displayraten der Bibliotheken

beider Vektoren wurden untersucht und unterscheiden sich unter den gewählten Bedingungen nicht signifikant. Antikörperselektionen mit Bibliotheken beider Vektoren brachten einen Binder gegen das Antigen JNK2 hervor, welcher der pHAL38 Bibliothek (nicht Codon-optimiert) zugeordnet werden konnte. Die spezifische Bindung konnte in weiterführende Analysen sowohl im ELISA als auch im Westernblot validiert werden. Zudem konnte die Spezifität des Klon FLT059-B6 auf Zelllysate demonstriert werden. Im Folgenden wurden die komplexen scFab Bibliotheken HAL11/12 auf Grundlage des pHAL38 generiert, da die Codon optimierte Variante keinerlei erkennbare Vorteile brachte und Klon FLT059-B6 durch eine Selektion mit der scFab Genbibliothek in diesem Vektor generiert wurde.

5.2 Die naive scFab-Phagenbibliothek

5.2.1 Klonierung von scFab Phagen Bibliotheken

Die Klonierung der scFab Bibliothek entsprach exakt der zuvor beschriebenen Generierung der Testbibliotheken. Zur Generierung einer $\sim 10^{10}$ großen Bibliothek wurden etwa 370 Einzeltransformationen benötigt. Dieser Wert ist vergleichbar zu anderen in der Literatur beschriebenen Bibliotheken gleicher Größenordnung^{131,144}.

Tiller *et al.* (2013) erreichten durch das Verwenden eines optimierten *E. coli* Stammes signifikant höhere Transformationsraten, was bei gleichem Aufwand zu einer mehr als zehnfach höheren Bibliothekendiversität führte¹⁷⁷. Des Weiteren waren bei einer parallel entwickelten scFv-Bibliothek die Transformationsraten verglichen mit der generierten scFab-Bibliothek um den Faktor zwei höher (persönliche Kommunikation PD Dr. Michael Hust). Gründe dafür können die Gesamtplasmidgröße oder die Ligationseffizienz sein²²⁷. Entscheidend bei der Generierung von komplexen Bibliotheken sind somit zum einen der gewählte *E. coli* Stamm als auch das Antikörperformat.

Etwa 90 % der HAL11/12 Bibliotheken tragen sowohl die leichte und als auch die schwere Kette. Dieser Wert liegt sogar über den beschriebener Bibliotheken auf Basis des pHAL-Vektorsystemes und folglich sollte dieser Faktor keinen negativen Einfluss auf die Selektion von Antikörperklonen haben¹³¹.

Die Generierung der Bibliotheken erfolgte durch PCR Amplifikation humaner Keimbahngene unter Verwendung etablierter Primersets. Durch den Vergleich der Keimbahnverteilung von HAL11/12 mit *in vivo* Daten und den scFv-Bibliotheken HAL7/8 sollte untersucht werden, ob durch das Spendermaterial oder die PCR Amplifikation Auffälligkeiten feststellbar waren.

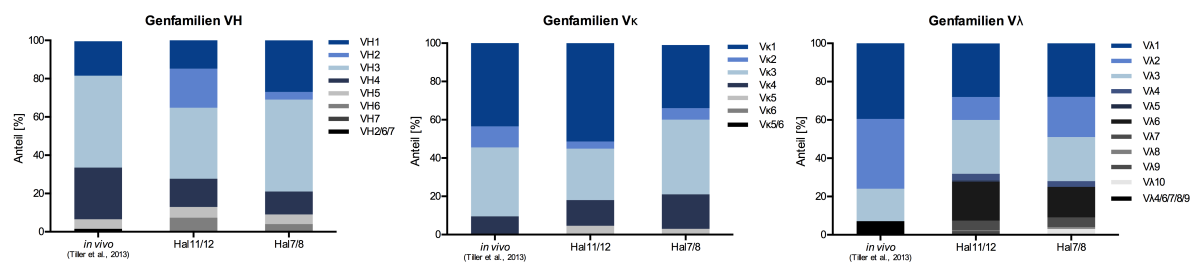


Abbildung 48: Vergleich der Verteilung der Genfamilien *in vitro*¹⁷⁷, den scFab Bibliotheken HAL11 und HAL12 und den scFv Bibliotheken HAL7 und HAL8 ermittelt durch Sequenzierung.

Die Verteilung der Keimbahnsequenzen *in vivo*, der HAL7/8 und HAL11/12 aufgeteilt in VH, Vk und VL ist in Abbildung 34 dargestellt.

Beim Betrachten der Verteilung der Keimbahngene der VH von HAL11/12 war auffällig, dass sich der Anteil der VH2 im Vergleich zur HAL7/8 und den *in vivo* Bedingungen signifikant unterschied. Der Anteil in der scFab Bibliothek machte insgesamt etwa 20 % aus. VH4 war sowohl im Fall der HAL7/8 als auch im Fall der HAL11/12 Bibliothek verglichen mit den *in vivo* Werten unterrepräsentiert. Weitere Auffälligkeiten waren nicht zu beobachten.

Die Verteilung der Genfamilie in VK entsprach etwa für beide Bibliotheken den *in vivo* Bedingungen. Im Fall von HAL11/12 war VK1 leicht über- VK3 leicht unterrepräsentiert.

Deutliche Unterschiede konnten für die Genfamilie VL festgestellt werden. *In vivo* konnte 90 % VK1/2/3 nicht nachgewiesen werden. Die Antikörpergenbibliotheken HAL7/8 und HAL11/12 enthielten zu gleichen Teilen VL1/2/3/6, deren Anteil etwa 90 % ausmachte. Die anderen Keimbahnen konnten nicht nachgewiesen werden. Die Funktion der Antikörpergenbibliotheken HAL7/8 sind ausführlich beschrieben¹³¹ Auf Grund der Ähnlichkeit der Keimbahnverteilung der Bibliotheken HAL11/12 zu HAL7/8 ist davon auszugehen, dass die generierten scFab Bibliotheken funktionsfähig sind.

5.2.2 Selektion von Antikörperfragmenten mittels Phagendisplay

Die Verwendung des Hyperphagen führt zu einem polyvalenten Display der Antikörperfragmente was bei der Antikörperselektion mit komplexen Bibliotheken Vorteile bringen kann^{228,229}. Die Verpackung aller generierten scFab Bibliotheken war durch die Verwendung des Hyperphagen möglich.

Etabliert wurde für die Antikörperphagenselektion mit pHAL Bibliotheken die Anzahl an eingesetzten Phagenpartikeln, welche die Diversität der Bibliothek um den Faktor 100 übersteigen⁸⁹. Dies erfordert eine große Menge an produzierten Phagen bei einer errechneten Diversität der scFab Bibliothek von ca. 10^{10} . Es konnte nachgewiesen werden, dass die Phagenproduktion im Falle der generierten Bibliothek hochskalierbar war und so ausreichende Mengen für Antikörperphagenselektionen produziert werden konnten. Unter

den für die Verpackung der Bibliothek gewählten Parametern sind Titer im Bereich von 10^{12} bestimmt worden. Verglichen zu Verpackungen mit M13K07 ist dieser Wert jedoch um den Faktor 100 geringer und könnte durch die Verwendung anderer modifizierter Helferphagen verbessert werden^{138,230}. Die Funktionalität der Bibliothek sollte jedoch durch die Verwendung der Hyperphage nicht beeinträchtigt sein, da dieser Helferphage bereits mehrfach auch für sehr große Bibliotheken erfolgreich eingesetzt wurde und zu erfolgreichen Panningresultaten führte^{131,177,231}.

Ziel ist es, die durch Transformation in *E. coli* generierte Diversität der Bibliothek während der Verpackung zu erhalten. Für die scFab Bibliotheken HAL11/12 konnten keine signifikanten Unterschiede vor und nach der Phagenverpackung ermittelt werden (außer VK6). Jedoch sind die Keimbahnen VH6, VK6 und VL8 nicht zu finden, welche aber auch *in vivo* nur selten auftreten sind¹⁷⁷. Ein Einfluss auf den Selektionsprozess von Antikörperfragmenten ist allerdings nicht zu erwarten, da tatsächlich selektierte Antikörpern einer scFv-Bibliothek keine der genannten Keimbahnen enthalten (Abbildung 49; persönliche Kommunikation PD Dr. Michael Hust).

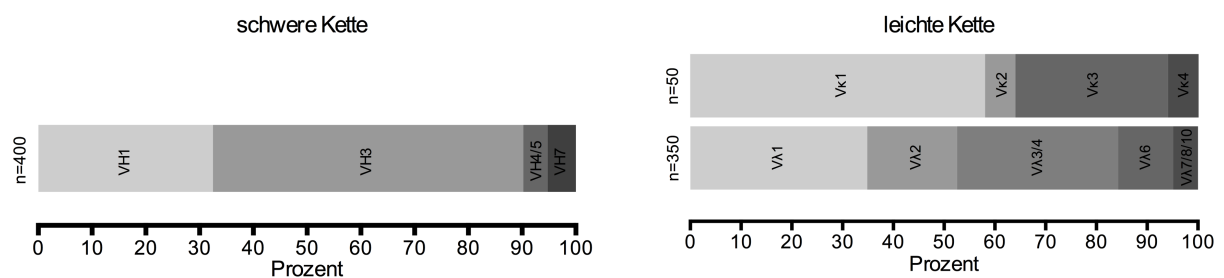


Abbildung 49: Übersicht der durch Sequenzierung ermittelten Keimbahnverteilung selektierter Antikörperklone der scFv Bibliothek HAL 9/10 (persönliche Kommunikation Dr. Jonas Kügler; Stand August 2014).

Die Testbibliotheken wurden zur Antikörperselektion gegen JNK2 und Lysozym verwendet. Gegen das Antigen JNK2 konnte erfolgreich unter etablierten Bedingungen der Klon FLT059-B6 selektiert werden und die Spezifität nachgewiesen werden. Klon FLT059-B6 ist somit weltweit das erste scFab Antikörperfragment, welches aus einer naiven Bibliothek stammt, da bisherige scFab Binder aus Immunbibliotheken mittels Hefen-Display generiert worden sind²³².

Für die Antikörperselektion mittels HAL11/12 wurde zunächst die für beschriebenen scFv Bibliotheken etablierte Methodik angewendet^{131,222,233}, führte jedoch nicht zur Selektion von spezifischen Antikörperphagen. Im Weiteren wurden verschiedene Parameter wie Elutionsbedingungen oder die Verwendung der Helferphage geändert. Auch diese Veränderungen führten nicht zur erfolgreichen Selektion. Um den Grund der nicht erfolgreichen Selektion zu klären wurden weitere Analysen zum scFab Format durchgeführt

5.2.3 Untersuchungen von Parametern des Selektionsprozesses

Es sollte untersucht werden in welchem Überschuss ein potentieller Binder während der Selektion vorhanden sein muss, um diesen im Panning detektieren zu können. Es wurden Antikörperphagen, die spezifisch für ein bestimmtes Antigen sind, in unterschiedlichen Konzentrationen der naiven Bibliothek beigemischt. Sowohl für den Antikörperklon D1.3 als auch für den HT186-D11 war es unter den gewählten Bedingungen nicht möglich diese Klone zu selektieren.

Der Klon D1.3 wurde aus einem Hybridom isoliert¹⁹¹, HT186-D11 stammt aus einer scFv-Immunbibliothek²³⁴ was Einfluss auf das Resultat haben könnte. Die Eignung als scFab ist fragwürdig, obwohl die Funktion beider Klone als lösliches scFab-Antikörper-Fragment und als Antikörperphage bereits in Teilen nachgewiesen werden konnte^{186,197}. Die Konvertierbarkeit von Antikörper in andere Formate kann einen Einfluss auf die Bindung haben²³⁵.

Die Größe der in *E. coli* exprimierten Proteine kann einen Einfluss auf die Expressionsmenge sowie die Löslichkeit haben²³⁶. Es sollte untersucht werden, ob das Verkürzen des pIII Fusionsproteins Auswirkungen auf den Selektionsprozess hat und Limitierungen des *E. coli* Systems zu Ausfällen bei der Selektion führten. Aus diesem Grund wurde weitere Bibliotheken generiert, bei denen Teile des gIII (im gIII-Fusionsprotein) deletiert wurden. Es wurden drei scFab Bibliotheken mit folgenden Eigenschaften generiert: Δ N1, Δ N2 und Δ N1+N2.

N1 und N2 spielen eine übergeordnete Rolle bei der *E. coli* Infektion⁹⁵ jedoch ist es möglich Antikörperfragmente mit Hilfe von Antikörperphagen zu selektieren, die Deletionen im gIII Fusionsprotein tragen^{106,107,237,238}. Die Antikörperphagenselektion mit den generierten Bibliotheken führte allerdings nicht zum Erfolg, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Größe der exprimierten Proteine in dem genannten Fall keine Limitierungen darstellt.

5.2.4 Untersuchung von Eigenschaften des scFab-Formats

Die Tauglichkeit einer komplexen naiven scFab Phagenbibliothek konnte bisher noch nicht demonstriert werden. Die Selektion von Antikörperfragmenten war in dieser Arbeit nur mit einer wenig diversen Testbibliothek möglich. Es wurden Parameter löslicher scFab sowie von scFab-Phagen untersucht, die im Folgenden diskutiert werden und in den Kontext der Antikörperphagenselektion gebracht werden sollen.

Bakterientiter und Phagentiter wurden über die Zeit in Korrelation gebracht und sollten Aufschluss über die Phagenverpackung geben. Die einzelnen Subbibliotheken verhielten sich jedoch sehr unterschiedlich, wodurch keine Aussage über die optimalen Bedingungen getroffen werden kann.

Die Produktion und Löslichkeit von Fab-Fragmenten ist abhängig von der Produktionstemperatur^{239,240}. Die Verpackung von Phagen wurde bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Anteil an Voll-Längenantikörpern verändert werden kann. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden und somit keine veränderte Bibliothekenqualität durch Temperaturänderungen während der Phagenverpackung festgestellt werden.

Die Produktion von Antikörperfragmenten im pHAL-Vektorsystem ist durch den Lac Promotor reguliert²⁰⁷. Eine Eigenschaft des Promotors ist, dass die transkriptionelle Kontrolle des Operons nicht 100 % effizient ist und es zu einer basalen Transkription in diesem Fall des Antikörperfragments kommt²⁴¹. Bei für *E. coli* toxischen Antikörperfragmenten kann dies zum Zelltod oder eingeschränktem Wachstum führen^{242,243}. Die abnehmende Voll-Längen Insert-Raten während des Pannings könnten somit durch eine basale Expression toxischer Antikörper erklärt werden, da kürzere Fragmente, mit einem geringeren Anteil an *E. coli* Fremdprotein, weniger toxisch sind. Antikörperklone mit weder leichter noch schwerer Kette könnten so einen Selektionsvorteil haben. Versuche durch Veränderung der Kulturbedingungen (30 °C und 37 °C) die basale Expression zu verringern und so die Voll-Längen Insert-Raten positiv zu beeinflussen, waren nicht erfolgreich.

Das scFab-Format eignet sich wie auch das scFv-Format zur Verwendung im Antigen-ELISA durch Nachweis über den Myc-tag. Vergleichende Experimente mit gereinigten scFv und scFab Antikörperfragmenten zeigten signifikante Unterschiede in Antigenbindung. Das Signal des scFabs im ELISA lag hier deutlich unter dem des scFv. Antikörperfragmente mit geringen Produktionsraten oder falscher Konformation sind im Screening daher nicht detektierbar, da das Signal-zu-Rausch Verhältnis zu gering ist. Jedoch führte eine in dieser Arbeit durchgeführte Optimierung der scFab-Produktion nicht zur Selektion spezifisch bindender Antikörperfragmente. Der alternative Ansatz Antikörperphagen anstelle von löslichen Fragmenten zu verwenden war ebenfalls nicht erfolgreich. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Änderung des Nachweises über einen Europium-Chelat-Komplex anstelle von HRP/TMB im ELISA zu einer Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses führen kann^{244,245}. Diese Vorgehensweise trug dennoch in den durchgeführten Experimenten nicht dazu bei, Antikörperklone mit spezifischen Bindungseigenschaften selektieren zu können.

Zur weiteren Charakterisierung des scFab-Formats wurden Analysen zur Bindung von löslichen scFabs und scFab-Phagen durchgeführt. Für das scFv Fragment konnte die Bindung belegt werden, das scFab Fragment jedoch zeigte unter identischen Bedingungen nahezu keine Bindung. Da die Konzentration beider Fragmente identisch war, lässt dieses Experiment auf Stabilität- oder Faltungsprobleme schließen.

Um die Bindungseigenschaften von scFab Phagen zu untersuchen, wurden SPR-Experimente von scFv und scFab Phagen durchgeführt. Kinetiken können durch diese

Methode nur begrenzt bestimmt werden, jedoch Antikörperphagen in ihrer Bindung untereinander verglichen werden²⁴⁶⁻²⁴⁹. In dieser Arbeit wurden M13K07 und Hyperphage verpackte Modellphagen untersucht. Für das Antikörperfragment D1.3 ergab das Experiment eine 10- bis 100-fach schlechtere Bindung der scFab-Phage verglichen mit der scFv-Phage. Auch dieses Experiment lässt vermuten, dass falsch gefaltete Antikörperfragmente die spezifische Bindung der scFab-Phagen beeinflussen könnten.

Auch Aggregation kann ein Grund für veränderte Bindungseigenschaften eines Antikörperfragmentes sein²⁵⁰. Die in dieser Arbeit durchgeführten SEC Analysen konnten bisherige Erkenntnisse bestätigen, dass die gewählten Modell-scFabs zu Aggregation neigen¹⁸⁶. In Abbildung 50 sind mögliche Aggregationsformen schematisch dargestellt.

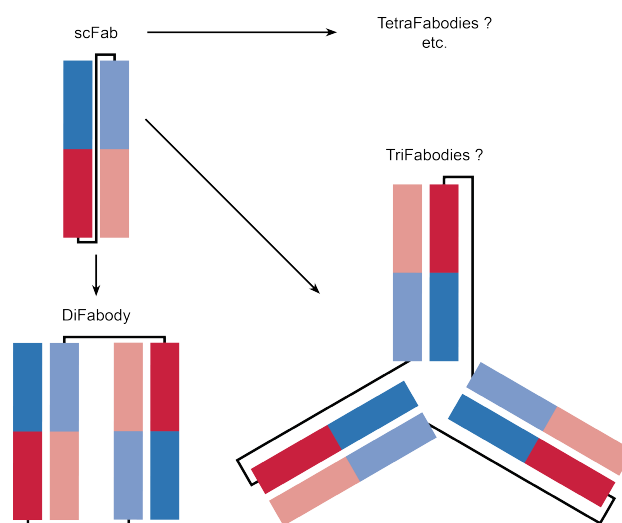


Abbildung 50: Schematische Darstellung möglicher Aggregatbildungen von scFab Antikörperfragmenten (verändert nach¹⁸⁶).

Analysen zu scFab-Antikörperphagen und deren Aggregationsverhalten sind bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit durchgeführte Fluoreszenzmikroskopie- und TEM-Analysen sollten Aufschluss über die Komplexbildung von scFab-Phagen geben. Sowohl die Fluoreszenzmikroskopie als auch die TEM-Aufnahmen lassen deutlich auf komplexbildende Phagen schließen. Unterschiede zwischen scFv- und scFab-Phagen sind allerdings nicht signifikant.

5.3 Fazit

Die in dieser Arbeit generierten Bibliotheken ermöglichten die Selektion des ersten scFab aus einer naiven Bibliothek mittels Phagen-Display. Zudem gehören sie mit einer Diversität von zusammen $\sim 10^{10}$ zu den größten beschriebenen Bibliotheken für Phagendisplay (siehe Tabelle 1-6). Dennoch konnte in 66 durchgeführten Pannings gegen 198 Antigene keine weiteren Binder selektiert werden. Obwohl Optimierungen im Bereich Antikörperproduktion, Phagenverpackung, Screening etc. durchgeführt wurden, führte dies nicht zur erfolgreichen Selektion von Antikörperfragmenten.

Schon Vorarbeiten durch Hust *et al.* (2007) deuteten auf Produktions-, Faltungs- und Expressionsprobleme des scFab-Formats in *E. coli* hin. Diese könnten Gründe dafür sein, dass eine Anreicherung von spezifischen scFabs während des Pannings nicht möglich war¹⁸⁶ und dadurch keine weitere erfolgreiche Selektion durchgeführt werden konnte. Darüber hinaus war es nicht möglich unter Verwendung der gleichen Bibliothek und den selben Bedingungen die Selektion des Antikörperklons FLT059-B6 gegen JNK2 zu reproduzieren. Weiterhin war es in ca. 200 durchgeführten Selektionsversuchen nicht möglich spezifische Antikörper zu generieren, was darauf schließen lässt, dass es sich bei Klon B6 um ein Zufallsprodukt handelt.

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, ob die in der Einleitung postulierten Vorteile des scFab gegenüber dem scFv vorliegen.

6 **Ausblick**

Die verminderten Bindungseigenschaften des scFab-Formats können durch Aggregation und falsche Faltung hervorgerufen worden sein. Durch Optimierungen im Bereich des Linkers könnte dieses Problem unter Umständen reguliert werden.

Darüber hinaus wurde in Arbeiten von Walker *et al.* gezeigt, dass sich das scFab-Format zur Selektion von Antikörperfragmenten im Hefendisplay eignet²³². Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss das Produktionssystem auf die Expression und Faltung des Formats hat.

Da in der durchgeführten Arbeit nur ein scFab-Binder selektiert werden konnte, wurde nicht geklärt, ob das scFab-Format Vorteile gegenüber dem scFv-Format hat. Des Weiteren konnten keine vergleichenden Experimente zum sclgG und dem scFv-Fc Fusionsprotein durchgeführt werden. Weitere Experimente sollten nach erfolgreicher Selektion von Antikörperfragmenten durchgeführt werden.

7 Zusammenfassung

Aus Antikörpergenbibliotheken wurden in der Vergangenheit monoklonale Antikörper für Therapie und Diagnostik generiert. Unterschiedliche Displaymethoden wurden hierfür verwendet. Eine etablierte Methode ist das Antikörperphagendisplay. Bei dieser werden Antikörperfragmente an Phagenoberflächenproteine fusioniert und ermöglichen so die Selektion spezifischer Binder gegen Antigene.

Weit verbreitet bei dieser Anwendung ist das scFv und das Fab Fragment. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein neues Antikörperformat für Antikörpergenbibliotheken zu testen: Das single chain Fab (scFab) Fragment. Hierfür wurde zunächst Spendern Blut entnommen, die Lymphozyten isoliert und die Antikörper kodierenden Bereiche durch PCR amplifiziert. Es folgte die Klonierung in Phagemide und die Produktion von Antikörperphagen. Im Anschluss wurde die generierte Bibliothek auf unterschiedlichen Antigenen getestet.

In etwa 200 Selektionen war es nur möglich einen Binder zu selektieren, dessen spezifische Bindung an das Antigen JNK2 durch unterschiedliche Experimente validiert werden konnte.

Daraufhin wurde im Weiteren untersucht, wie die Selektion verbessert werden kann. Dazu wurde die Produktion von Antikörpern, das Screening, die Selektion sowie das Format näher untersucht. Aggregation oder falsche Faltung von scFabs ließen darauf schließen, dass keine erfolgreiche Selektion unter den gewählten Bedingungen möglich ist.

8 Summary

In the past antibody gene libraries were used for the selection of monoclonal antibodies for therapy and diagnostic. Different display methods were used. One well established method is antibody phage display. Antibody fragments are fused to phage surface proteins which enables the selection of specific binders against antigens.

The usage of scFv and Fab fragments is widely spread for this kind of method. Aim of this project was the establishment of a new antibody format, the single chain fab (scFab) format, for compatibility with antibody phage display. At first, donor blood was taken to isolate lymphocytes and the isolation of antibody coding regions by PCR. Afterwards fragments were cloned into phagemids and antibody phage were produced. Following, the generated antibody library was tested on various antigens

In approximately 200 selections it was only possible to select one binder, with a well-validated specificity against the antigen JNK2.

Thereupon analysis for better selection process was done. Antibody production, screening, selection and scFab format was analyzed in detail. Aggregation or misfolding of scFabs might be the reason for non-successful selection under used conditions.

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampicilin
Ad	Adapter
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AK / Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	<i>Constant</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CDR	<i>Complement Determing Region</i>
cen	<i>Centromer</i>
cfu	<i>Colony Forming Units</i>
CH	<i>constant heavy</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIP	<i>Calf Intestine Protease</i>
Cre	<i>cyclization recombination</i>
D	Durchlauf
D	<i>Diversity</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
engl.	englisch
f / for	<i>forward</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fab	<i>Fragment Antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT	Florian Tomszak
Fv	<i>Fragment variable</i>
G	Glukose
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Gly-Ser	Glycin-Serin
H	<i>Heavy</i>
H6JNK2	6 Histidin JNK2
HAL	<i>Hust Antibody Library</i>
HAL	<i>Human Antibody Library</i>
HEK	<i>Human Embryonal Kidney</i>
hFc	Humaner IgG1-Fc-Teil
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IGH	<i>Immunoglobulin Heavy</i>
IGK	<i>Immunoglobulin Kappa</i>
IGL	<i>Immunoglobulin Lambda</i>

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleucin
IMAC	<i>Immobilised Metal Ion Affinity Chromaography</i>
INN	<i>International Nonproprietary Name</i>
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
J	<i>Joining</i>
JNK2	c-Jun N-terminale Kinasen
kb	Kilobasenpaare
k_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k_{off}	Dissoziationsrate
k_{on}	Assoziationsrate
L	<i>light</i>
Lox	<i>Locus</i>
Lys	Lysin
M	Marker
M	Molar
M	Milchpulver
Mak	Monoklonaler Antikörper
MRF	<i>Minus Restriction</i>
mRNA	messenger RNA
MTP	Mikrotiterplatte
MUC1	Mucin1
N-Terminus	Amino-Terminus
NBT	Nitroblautetrazolium
Neg. / N	Negativkontrolle
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
pelB	Signalpeptidsequenz zum Transport des Proteins in das Periplasma
pfu	<i>Plaque forming units</i>
pIII	Protein III
PPP	periplasmatische Präparation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pVIII	Protein VIII
r / rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Zellultumedium, am Roswell Park Memorial Institute entwickelt
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Resonance Units</i>
scFab	<i>single chain Fab</i>
scFv	<i>single chain Fragment variable</i>
sclgG	<i>Single chain IgG</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Ser	Serin
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolic repression</i>
spez.	spezifisch
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
ssRNA	<i>Single-Stranded RNA</i>
T	Tween
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N-Tetramethylethylendiamin
ter	<i>Terminus</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer-RNA</i>
U	Uridin

U	<i>Unit</i>
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VH	<i>variable heavy</i>
VL	<i>variable light</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	<i>World Health Organization</i>
wt	Wildtyp

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Seitenkettentheorie von Paul Ehrlich ⁹	2
Abbildung 2: Detaillierte Darstellung des Immunglobulin G	3
Abbildung 3: Lokalisation der humanen Immunglobulingene ³⁰⁻³²	4
Abbildung 4: Organisation und Rearrangement von Keimbahngenen ¹⁷	5
Abbildung 5: Schematische Darstellung verschiedener Antikörperfragmente und Fusionsproteine	6
Abbildung 6: Schematische Darstellung fortschreitender Humanisierung eines monoklonalen Maus Antikörpers	7
Abbildung 7: Ereignisse von 1973 bis 2010, die zur Generierung monoklonaler Antikörper und Fc-Fusionsproteinen führten (verändert nach ¹²).	8
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Immunantwort über die Zeit. Dargestellt ist die IgM und die IgG Konzentration (verändert nach ¹⁷).	9
Abbildung 9: Schematische Darstellung zur Generierung von Hybridomen und der Selektion von Antikörpern (verändert nach ⁵⁹).	10
Abbildung 10: A: Schematischer Aufbau einer M13 Phage sowie Vorkommen, Größe und Molekulargewicht der Oberflächenproteine ⁹⁰ ; B: Elektronenmikroskopische Aufnahme von M13K07 Phagen (Dr. Rhiel, Universität Oldenburg).	13
Abbildung 11: A: schematische Darstellung des Infektionsmechanismus eines Phagen (verändert nach ⁹⁵); B: schematische Darstellung der Phagenproduktion von der Phageninfektion bis zur Assemblierung und der Sekretion ⁹²	14
Abbildung 12: Das Display von Antikörpern auf dem pIII oder dem pVIII von Phagen oder Phagemiden ⁹⁹ (Vektoren: ¹⁰⁰⁻¹⁰⁴).	15
Abbildung 13: Ablauf zur Generierung einer naiven Antikörperbibliothek.	20
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Pannings (der Selektion von Antikörperphagen mittels Phagendisplay-Technologie) (verändert nach ⁸⁹).	21
Abbildung 15: A: Aufbau des zur Klonierung verwendeten Phagemidvektors; B: Schematische Darstellung eines Phagen mit pIII::scFab Fusionsprotein.	40
Abbildung 16: Analyse des produzierten Antikörperklons D1.3 als scFab im pHAL38 und pHAL43 sowie als scFv im pHAL14. Immunoblot eines 12 %igen SDS Gels zum Nachweis der Produktion löslicher Antikörperfragmente. Aufgetragen sind 10 µL Produktionsüberstand. Der Nachweis erfolgte durch ein α-Myc-tag Antikörper (9E10) und einen Ziege-α-Maus IgG AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat.	41
Abbildung 17: Detektierte pIII-Fusionsbanden im Immunoblot drei verschiedener Vektorsysteme zur Generierung von scFab und scFv Phagenbibliotheken.....	42
Abbildung 18: Transformationsraten und Gesamtbibliothekengrößen der pHAL38 und pHAL43 Testbibliotheken.	43
Abbildung 19: Voll-Längen Insert-Raten ermittelt durch Kolonie PCR der Testbibliotheken in pHAL38 und pHAL43 sowie der scFv Antikörperbibliotheken HAL7 und HAL8 ¹³¹	44
Abbildung 20: Ermittelte Titer der scFab Bibliotheken auf Basis des pHAL38 und pHAL43 nach der Verpackung mit M13K07 und Hyperphage.	44
Abbildung 21: Analyse der Antikörperfusionen in den scFab-Bibliotheken auf Basis der Vektoren pHAL38 und pHAL43. Immunoblot eines 12 %igem SDS Gels zum Nachweis der Produktion löslicher Antikörperfragmente. Aufgetragen sind 10 µL Produktionsüberstand. Der Nachweis erfolgte durch ein α-Myc-Tag Antikörper (9E10) und einen Ziege anti-Maus IgG AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat....	45
Abbildung 22: Screenings nach der Selektion mit den scFab Testbibliotheken auf Basis von pHAL38 und pHAL43; 100 ng immobilisiertes Antigen wurde mit 100 µL bakteriell exprimierten scFab inkubiert. Der Nachweis erfolgte über einen Maus anti-C-Myc-tag Antikörper und einen Ziege α-Maus IgG (Fab-spezifischen) HRP-konjugierten Antikörper	

und TMB-Substrat; A: Screening von 48 scFab Fragmenten der Bibliothek auf Basis des pHAL38 gegen das Antigen JNK2 und die Kontrolle Streptavidin; B: Screening von 48 scFab Fragmenten der Bibliothek auf Basis des pHAL38 gegen das Antigen Lysozym und die Kontrolle Streptavidin; C: Screening von 48 scFab Fragmenten der Bibliothek auf Basis des pHAL43 gegen das Antigen JNK2 und die Kontrolle Streptavidin; D: Screening von 48 scFab Fragmenten der Bibliothek auf Basis des pHAL43 gegen das Antigen Lysozym und die Kontrolle Streptavidin.....	46
Abbildung 23: Bindung des Klonen FLT059-B6 als scFab an das rekombinante Antigen H6JNK6 im ELISA zur Überprüfung der Spezifität. Jeweils 100 ng/Kavität JNK2, Streptavidin bzw. BSA als Kontrolle wurden immobilisiert und mit 100 µL Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:2 mit MPBS-T titriert. Der Nachweis erfolgte über einen Maus α -Myc-tag Antikörper und einen Ziege α -Maus IgG (Fab-spezifisch) HRP-konjugierten Antikörper und TMB-Substrat.	47
Abbildung 24: Analysen des produzierten Antikörperklons FLT059-B6 als scIgG; A: Immunoblot eines 12 %igen SDS Gels zum Nachweis der Produktion eines scIgG nach der Affinitätsreinigung. Aufgetragen sind 10 µL gereinigtes Protein. Der Nachweis erfolgte durch einen Ziege anti-Maus Maus (Fc-spezifisch) AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat; B: Größenausschluss-chromatographie des Antikörperklons FLT059-B6 als scIgG. Es wurde die Säule HiLoad10/300 Superdex200 Increase und eine Flussrate von 0,7 mL/min verwendet.....	48
Abbildung 25: Analysen des produzierten Antikörperklons FLT059-B6 als scIgG; A: Bindung des Klonen FLT059-B6 als scIgG an das rekombinante Antigen H6JNK6 im ELISA zur Überprüfung der Spezifität. Jeweils 100 ng/Kavität JNK2, Streptavidin bzw. BSA als Kontrolle wurden immobilisiert und mit jeweils 1 µg Antikörper inkubiert. Der Nachweis erfolgte über einen Maus α -Myc-tag Antikörper und einen Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifischen) HRP-konjugierten Antikörper und TMB-Substrat. B: Immunoblot eines 12 %igen SDS-Gels zum Nachweis der Spezifität löslicher Antikörperfusionen.....	48
Abbildung 26: Diversität der generierten scFab-Antikörpergenbibliotheken aufgeteilt in Kappa und Lambda und Transformationsraten der Einzeltransformationen.	49
Abbildung 27: Voll-Längen Insert-Raten der generierten scFab Antikörpergenbibliotheken aufgeteilt in Kappa und Lambda.	50
Abbildung 28: Analyse der Antikörperfusionen in den scFab Subbibliotheken aufgeteilt nach Kappa und Lambda. Immunoblot eines 12 %igen SDS Gels zum Nachweis der pIII Fusionen. Aufgetragen sind 1×10^9 Phagen nach der Fällung durch PEG/NaCl. Der Nachweis erfolgte durch einen Ziege anti-Maus Maus (Fc-spezifisch) AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat.....	51
Abbildung 29: Analyse der Antikörperfusionen in den scFab Bibliotheken HAL11 und HAL 12. Immunoblot eines 12 %igen SDS-Gels zum Nachweis der pIII-Fusionen. Aufgetragen sind 1×10^9 Phagen nach der Fällung durch PEG/NaCl. Der Nachweis erfolgte durch einen Ziege anti-Maus (Fc-spezifisch) AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat.....	52
Abbildung 30: Verteilung der Genfamilien in den scFab Bibliotheken HAL11 und HAL12 vor und nach der Phagenverpackung ermittelt durch Sequenzierung.	52
Abbildung 31: Anzahl der selektierten Antikörper mit der Antikörperbibliothek HAL9/10 gegen 57 Antigene (persönliche Kommunikation PD Dr. Michael Hust, Stand Juli 2014).	56
Abbildung 32: Vergleich verschiedener Elutionsmethoden von Phagen. 1×10^9 spezifische Phagen wurden verwendet und auf 100 ng/Kavität Antigen inkubiert. Die Elution erfolgte über Trypsin, HCl/Glycin und TAE. Die cfu wurde durch einen Phageninfektionstest bestimmt.....	57
Abbildung 33: Schematische Darstellung der verwendeten Helferphage in den Selektionsrunden.	58
Abbildung 34: Diversität der generierten scFab-Antikörpergenbibliotheken auf Basis des pHAL22, pHAL23 und pHAL24 aufgeteilt in Kappa und Lambda und Transformationsraten der Einzeltransformationen.	60

Abbildung 35: Ergebnisse polyklonaler Phagen ELISA aller drei Selektionsrunden. 100 µL Phagenüberstand wurde nach den Selektionsrunden zur Inkubation auf 100 ng/Kavität Antigen verwendet. Der Nachweis erfolgte über einen Maus α-pVIII HRP-konjugierten Antikörper und TMB-Substrat.....	60
Abbildung 36: Übersicht produzierter Antikörperphagen der Klone HT186-D11 und D1.3 mit den Helferphagen M13K07 und Hyperphage.....	61
Abbildung 37: Abhängigkeiten der Bakteriendichte zur Menge der produzierten Phagen. Die Bestimmung der Bakterienmenge erfolgte fotometrisch. Die Menge der Phagen im Überstand wurde durch einen Phageninfektionstest ermittelt. Dargestellt ist eine Übersicht der Verpackung von sechs Lambda Subbibliotheken über 15 Stunden.	62
Abbildung 38: Vergleich der Anzahl an scFab Fragmenten mit Voll-Längen Insert-Raten bei den Inkubationstemperaturen 30 °C und 37 °C. Die erfolgte Bestimmung durch Kolonie PCR.....	63
Abbildung 39: Analyse der bakteriell produzierten Antikörperklone D1.3 und HT186-D11 als scFab und scFv. SDS-PAGEs von 12 %igen SDS Gelen zum Nachweis der Produktion löslicher Antikörperfragmente. Aufgetragen sind 10 µL der Elutionsfraktionen einer IMAC Reinigung. Der Nachweis erfolgte durch das Färben mit Coomassie-Brillant-Blau.	66
Abbildung 40: Analyse der in säugerzellbasierte Expression von den Antikörperklonen D1.3 und HT186-D11 als scFab und scFv. SDS-PAGEs von 12 %igen SDS-Gelen zum Nachweis der Produktion löslicher Antikörperfragmente. Aufgetragen sind 10 µL der Elutionsfraktionen einer Profinia-Reinigung (His-Trap 1 mL). Der Nachweis erfolgte durch das Färben mit Coomassie-Brillant-Blau.....	67
Abbildung 41: Analysen der säugerzellbasierten Expression der Antikörperklone D1.3 und HT186-D11 als scFab und scFv; Für die Größenausschluss-chromatographie der Antikörperklone wurde die Säule HiLoad16-60 Superdex200 und eine Flussrate von 0,5 mL/min verwendet; A: HT186-D11 scFab; B: HT186-D11 scFv; C: D1.3 scFab; D: D1.3 scFv.....	68
Abbildung 42: A: Ergebnisse zur Überprüfung der Funktionalität von biotinylierten Lysozym. 100ng biotinyliertes Lysozym wurde immobilisiert. Das Immobilisierte Antigen wurde mit 100 µL Phagenüberstand bzw. Streptavidin-HRP inkubiert. Der Nachweis erfolgte für die Phagen über einen Maus α-pVIII HRP-konjugierten Antikörper und TMB-Substrat für das Streptavidin-HRP nur über TMB-Substrat, M13K07 und ein Maus α-pVIII-HRP-konjugierten-Antikörper ohne vorherige Inkubation mit scFab- oder scFv-Phagenüberstand dienten zur Kontrolle; B: Analyse der bakteriell produzierten Antikörperklone D1.3 als scFab und scFv. Native Blots von 6 %igen Gelen zum Nachweis der Bindungseigenschaften löslicher Antikörperfragmente. Aufgetragen sind 1 µg Protein einer präparativen SEC. Die Gele wurden auf Nitrozellulose geblottet. Der Nachweis erfolgte durch Inkubation mit biotinylierten Lysozym und Streptavidin-HRP. Die Farbreaktion wurde durch eine DAB Färbung hervorgerufen.	69
Abbildung 43: SPR Analysen zum Nachweis der spezifischen Bindung von Antikörperphagen. A: Nachweis der Bindung von D1.3 scFv- und scFab-Phagen an das an einen CM5 Chip immobilisierte Antigen Lysozym. Verwendet wurden 10 ⁹ pfu/mL, 10 ⁸ pfu/mL und 10 ⁷ pfu/mL scFv- und scFab-Phagen. B: Nachweis der Bindung von HT186-D11 scFv- und scFab-Phagen an das an einen CM5 Chip immobilisierte Antigen MUC1. Verwendet wurden 10 ⁹ pfu/mL, 10 ⁸ pfu/mL und 10 ⁷ pfu/mL scFv- und scFab-Phagen. .	70
Abbildung 44: Darstellung der ermittelten Regressionen aus Abbildung 43. A: Steigung der Phagenbindung des Klones D1.3 an das Antigen Lysozym; B: Regressionen der Phagenbindung des Klones HT186-D11 an das Antigen MUC1.	70
Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen von Antikörperphagen. 1x10 ⁹ Antikörperphagen in 100 µL PDB wurden mit einem Maus α-pVIII FITC konjugierten Antikörper für eine Stunde präinkubiert. 10µL der Phagenlösung wurde auf einen Objektträger getropft und mikroskopische Aufnahmen erstellt (Christian Boedeker, DSMZ Braunschweig).	71

Abbildung 46: Ermittelte Fragmentgrößen spezifischer Antikörperphagen im scFv- und scFab-Format ermittelt durch Fluoreszenzmikroskopie.	72
Abbildung 47: TEM Aufnahmen von Antikörperphagen im scFv und scFab-Format sowie der HAL11 scFab Antikörperbibliothek und der Kontrolle M13K07 (Dr. Rhiel, Universität Oldenburg).	73
Abbildung 48: Vergleich der Verteilung der Genfamilien in vitro ¹⁷⁷ , den scFab Bibliotheken HAL11 und HAL12 und den scFv Bibliotheken HAL7 und HAL8 ermittelt durch Sequenzierung.	78
Abbildung 49: Übersicht der durch Sequenzierung ermittelten Keimbahnverteilung selektierte Antikörperklone der scFv Bibliothek HAL 9/10 (persönliche Kommunikation Dr. Jonas Kügler; Stand August 2014).	79
Abbildung 50: Schematische Darstellung möglicher Aggregatbildungen von scFab Antikörperfragmenten (verändert nach ¹⁸⁶).	82

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Übersicht der unterschiedlichen Antikörperklassen und deren Isoformen	2
Tabelle 1-2: Länge der Aminosäuresequenz der CDR von V _L und V _H nach Chothia ²⁹	3
Tabelle 1-3: Geschätzte Anzahl an Keimbahnsegmenten (verändert nach ¹⁷)	5
Tabelle 1-4: Durch die FDA zugelassene Antikörper (Stand August 2014) ⁴⁰	6
Tabelle 1-5: Beschriebene Phagen-Display-Vektoren sowie Eigenschaften des pIII und das verwendete Antikörperformat ¹⁰⁵	16
Tabelle 1-6: Beschriebene Phagendisplay-Bibliotheken ¹⁰⁵	18
Tabelle 3-1: Verwendete Geräte	24
Tabelle 3-2: Verwendete Computerprogramme und Datenbanken	25
Tabelle 3-3: Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3-4: Verwendete kommerzielle Kits und Säulen	26
Tabelle 3-5: Enzyme und zugehörige Puffer	26
Tabelle 3-6: Verwendete Antiseren und kommerzielle Antikörper	26
Tabelle 3-7: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer	26
Tabelle 3-8: Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien	29
Tabelle 3-9: Verwendete Medien und Supplemente	29
Tabelle 3-10: Verwendete Vektoren	30
Tabelle 3-11: Verwendete Oligonukleotide	30
Tabelle 3-12: Sonstiges	31
Tabelle 3-13: PCR Amplifikationsprotokoll	32
Tabelle 3-14: Zusammensetzung der PCR Reaktion	33
Tabelle 3-15: Zusammensetzung des Restriktionsverdau mit Endonukleasen	33
Tabelle 3-16: Zusammensetzung der Ligation	34
Tabelle 3-17: Zusammensetzung des Sammelgels	37
Tabelle 3-18: Zusammensetzung des Trenngels	37
Tabelle 4-1: Übersicht der Phagentiter nach Verpackung der Subbibliotheken der generierten scFab Antikörpergenbibliotheken aufgeteilt in Kappa und Lambda	50
Tabelle 4-2: Ermittelte Phagentiter der Antikörpergenbibliotheken HAL11 und HAL 12 nach der Fällung durch PEG/NaCl	51
Tabelle 4-3: Übersicht der verwendeten Antigene zur Antikörperphagenselektion sowie deren Eigenschaften.	54
Tabelle 4-4: Ergebnisse der automatisierten Antikörperselektionen gegen vier Antigene mit den Bibliotheken HAL7/8 und HAL11/12	57
Tabelle 4-5: Übersicht der selektierten Binder aus gespickten scFab-Bibliotheken nach drei Selektionsrunden	59
Tabelle 4-6: Übersicht der Produktionsmengen in säugerzellbasierter Aexpression von produzierten Antikörperfragmenten unter Berücksichtigung der Korrekturfaktoren	66

12 Literaturverzeichnis

1. Singer, C. & Underwood, E. A. *Singer and Underwood (1962) A short history of medicine.* (1962).
2. Zwister, O. Vor 100 Jahren: Die Entdeckung des Diphtherie-Heilserums. **4**, 153–159 (1990).
3. Browning, C. H. *Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei thieren.* (Deutsche Medizinische Wochenschrift, 2005).
4. Gronski, P., Seiler, F. R. & Schwick, H. G. Discovery of antitoxins and development of antibody preparations for clinical uses from 1890 to 1990. *Mol Immunol* **28**, 1321–1332 (1991).
5. Stokes, J., Jr, Maris, E. P. & Gellis, S. S. *The use of concentrated normal human serum gamma globulin (human immune serum globulin) in the prophylaxis and treatment of measles.* (J. Clin. Investigation, 1944).
6. Dale, H. *Paul Ehrlich, born March 14, 1854.* *Br Med J* **1**, 659–663 (1954).
7. MacNalty, A. S. Emil von behring. *British Medical Journal* (1954).
8. Browning, C. H. Emil Behring and Paul Ehrlich: Their Contributions to Science. *Nature* **175**, 570–575 (1955).
9. Ehrlich, P. Croonian lecture: on immunity with special reference to cell life. in (1899).
10. Immunisation against infectious disease--1996 Edward Jenner Bicentenary Edition. *Commun Dis Rep CDR Wkly* **6**, 339 (1996).
11. Karpas, A. *et al.* Effects of passive immunization in patients with the acquired immunodeficiency syndrome-related complex and acquired immunodeficiency syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 9234–9237 (1988).
12. Strohl, W. R. & Strohl, L. M. *Therapeutic Antibody Engineering.* *BioDrugs* **25**, 696–11 (Elsevier, 2012).
13. Dall'Acqua, W. F., Kiener, P. A. & Wu, H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *Journal of Biological Chemistry* **281**, 23514–23524 (2006).
14. Roopenian, D. C. & Akilesh, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* **7**, 715–725 (2007).
15. Baker, K. *et al.* Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor, FcRn. *Semin Immunopathol* **31**, 223–236 (2009).
16. Suzuki, T. *et al.* Importance of Neonatal FcR in Regulating the Serum Half-Life of Therapeutic Proteins Containing the Fc Domain of Human IgG1: A Comparative Study of the Affinity of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins to Human Neonatal FcR. *The Journal of Immunology* **184**, 1968–1976 (2010).
17. Murphy, K. *Janeway's Immunobiology, Eighth Edition.* (Garland Science, 2011).
18. Bongers, J., Burman, S., Hilliard, G. M. & Mozdzanowski, J. Assignment of Disulfide Pairings in an IgG1 Monoclonal Antibody: Comparison of a New Trypsin/Glu-C Approach Versus Fragmentation with Pepsin.
19. Bagal, D., Valliere-Douglass, J. F., Balland, A. & Schnier, P. D. Resolving disulfide structural isoforms of IgG2 monoclonal antibodies by ion mobility mass spectrometry. *Anal. Chem.* **82**, 6751–6755 (2010).
20. Martinez, T., Guo, A., Allen, M. J., Han, M. & Pace, D. Disulfide connectivity of human immunoglobulin G2 structural isoforms. *Biochemistry* (2008).
21. Schuurman, J., Perdok, G. J., Gorter, A. D. & Aalberse, R. C. The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds. *Mol Immunol* **38**, 1–8 (2001).
22. Luftig, M. A. *et al.* Structural basis for HIV-1 neutralization by a gp41 fusion intermediate-directed antibody. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 740–747 (2006).
23. Wu, T. T. & Kabat, E. A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.* **132**, 211–250 (1970).

24. Sequences of Proteins of Immunological Interest. (1992).
25. Chothia, C. & Lesk, A. M. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* **196**, 901–917 (1987).
26. Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. & Chothia, C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* **273**, 927–948 (1997).
27. Lefranc, M. P. *et al.* IMGT(R), the international ImMunoGeneTics information system(R). *Nucleic Acids Research* **37**, D1006–D1012 (2009).
28. Kirkham, P. M. & Schroeder, H. W. Antibody structure and the evolution of immunoglobulin V gene segments. *Semin. Immunol.* **6**, 347–360 (1994).
29. <http://www.bioinf.org.uk>. (August 2014)
30. Lefranc, M. P. Nomenclature of the Human Immunoglobulin Heavy (IGH) Genes. *Exp Clin Immunogenet* **18**, 100–116 (2001).
31. Lefranc, M. P. Nomenclature of the Human Immunoglobulin Kappa (IGK) Genes. *Exp Clin Immunogenet* **18**, 161–174 (2001).
32. Lefranc, M. P. Nomenclature of the Human Immunoglobulin Lambda (IGL) Genes. *Exp Clin Immunogenet* **18**, 242–254 (2002).
33. Dreyer, W. J. & Bennett, J. C. The molecular basis of antibody formation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1965).
34. LaFleur, D. W. *et al.* Monoclonal antibody therapeutics with up to five specificities: Functional enhancement through fusion of target-specific peptides. *MAbs* **5**, 208–218 (2013).
35. Holliger, P. & Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **23**, 1126–1136 (2005).
36. Generation and production of engineered antibodies. **26**, 39–60 (2004).
37. Potent antibody therapeutics by design. **6**, 343–357 (2006).
38. Antibodies to watch in 2014. **6**, 5–14 (2013).
39. <http://www.imgt.org/mAb-DB/index>. (August 2014)
40. Chowdhury, P. S., Viner, J. L., Beers, R. & Pastan, I. Isolation of a high-affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 669–674 (1998).
41. Sáez-Llorens, X. *et al.* Safety and pharmacokinetics of an intramuscular humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia. The MEDI-493 Study Group. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**, 787–791 (1998).
42. Huls, G. A. *et al.* A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnol* **17**, 276–281 (1999).
43. Nagy, Z. A. *et al.* Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nature Medicine* **8**, 801–807 (2002).
44. Reichert, J. M. Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* **4**, 413–415 (2012).
45. Kettleborough, C. A., Saldanha, J., Heath, V. J., Morrison, C. J. & Bendig, M. M. Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting: the importance of framework residues on loop conformation. *Protein Eng* **4**, 773–783 (1991).
46. Saldanha, J. W., Martin, A. & Léger, O. A single backmutation in the human kIV framework of a previously unsuccessfully humanized antibody restores the binding activity and increases the secretion in. *Molecular Immunology* (1999).
47. Clark, M. Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? *Immunology Today* (2000).
48. Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J. & DuBridge, R. B. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs* **2**, 256–265 (2010).
49. Aliberti, J. *Control of Innate and Adaptive Immune Responses during Infectious Diseases*. (Springer, 2011).

50. Albitar, M. *Monoclonal Antibodies*. (Springer Science & Business Media, 2007).
51. Köhler, G. & Milstein, C. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. 1975. *J. Immunol.* **174**, 2453–2455 (2005).
52. Cotton, R. & Milstein, C. Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature* (1973).
53. Staquet, K., Fisher, J., Lamb, R., Bannish, G. & Duchala, C. A rapid and efficient method for generating anti-variable region monoclonal antibodies using type-1 interferons as immune modulators. *Hum Antibodies* (2006).
54. Groves, D. J. & Morris, B. A. Review: Veterinary Sources of Nonrodent Monoclonal Antibodies: Interspecific and Intraspecific Hybridomas. *Hybridoma* (2000).
55. Pandey, S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Hybridoma* (2010).
56. Sibénil, S. *et al.* Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: Impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory FcγR functions. *Clinical Immunology* **118**, 170–179 (2006).
57. Crosnier, C., Staudt, N. & Wright, G. J. A rapid and scalable method for selecting recombinant mouse monoclonal antibodies. *BMC Biology* **8**, 76 (2010).
58. Ryczyn, M. A. *et al.* The Use of an Anti-CD40 Agonist Monoclonal Antibody During Immunizations Enhances Hybridoma Generation. *Hybridoma* **27**, 25–30 (2008).
59. Joyce, J. G. & Meulen, ter, J. Pushing the envelope on HIV-1 neutralization. *Nat Biotechnol* **28**, 929–931 (2010).
60. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317 (1985).
61. Gai, S. A. & Wittrup, K. D. Yeast surface display for protein engineering and characterization. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 467–473 (2007).
62. Boder, E. T. & Wittrup, K. D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* **15**, 553–557 (1997).
63. van den Beucken, T. *et al.* Affinity maturation of Fab antibody fragments by fluorescent-activated cell sorting of yeast-displayed libraries. *FEBS Lett* **546**, 288–294 (2003).
64. VanAntwerp, J. J. & Wittrup, K. D. Fine affinity discrimination by yeast surface display and flow cytometry. *Biotechnol. Prog.* **16**, 31–37 (2000).
65. Shusta, E. V., Kieke, M. C., Parke, E. & Kranz, D. M. Yeast polypeptide fusion surface display levels predict thermal stability and soluble secretion efficiency. *Journal of molecular Biology* (1999).
66. Rakestraw, A. & Wittrup, K. D. Contrasting secretory processing of simultaneously expressed heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 896–905 (2006).
67. Weaver-Feldhaus, J. M., Lou, J., Coleman, J. R. & Siegel, R. W. Yeast mating for combinatorial Fab library generation and surface display. *FEBS Lett* (2004).
68. Blaise, L. *et al.* Construction and diversification of yeast cell surface displayed libraries by yeast mating: application to the affinity maturation of Fab antibody fragments. *Gene* **342**, 211–218 (2004).
69. Boder, E. T., Midelfort, K. S. & Wittrup, K. D. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 10701–10705 (2000).
70. Graff, C. P., Chester, K., Begent, R. & Wittrup, K. D. Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 degrees C. *Protein Engineering Design and Selection* **17**, 293–304 (2004).
71. Siegel, R. W., Coleman, J. R., Miller, K. D. & Feldhaus, M. J. High efficiency recovery and epitope-specific sorting of an scFv yeast display library. *J Immunol Methods* **286**, 141–153 (2004).
72. Chao, G., Cochran, J. R. & Wittrup, K. D. Fine epitope mapping of anti-epidermal growth factor receptor antibodies through random mutagenesis and yeast surface display. *J Mol Biol* **342**, 539–550 (2004).
73. Weaver-Feldhaus, J. M., Miller, K. D., Feldhaus, M. J. & Siegel, R. W. Directed

- evolution for the development of conformation-specific affinity reagents using yeast display. *Protein Engineering Design and Selection* **18**, 527–536 (2005).
74. Wang, K. C. *et al.* Yeast surface display of antibodies via the heterodimeric interaction of two coiled-coil adapters. *J Immunol Methods* **354**, 11–19 (2010).
 75. Wang, Y., Keck, Z.-Y. & Fountoulas, S. K. H. Neutralizing Antibody Response to Hepatitis C Virus. *Viruses* **3**, 2127–2145 (2011).
 76. Ho, M., Nagata, S. & Pastan, I. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 9637–9642 (2006).
 77. Beerli, R. R. *et al.* Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 14336–14341 (2008).
 78. Smith, E. S. & Zauderer, M. *Bacterial Display of Antibodies. Therapeutic Monoclonal Antibodies* 255–281 (2009).
 79. Harvey, B. R. *et al.* Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from Escherichia coli-expressed libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 9193–9198 (2004).
 80. Harvey, B. R. *et al.* Engineering of recombinant antibody fragments to methamphetamine by anchored periplasmic expression. *J Immunol Methods* **308**, 43–52 (2006).
 81. Löfblom, J., Sandberg, J., Wernérus, H. & Ståhl, S. Evaluation of staphylococcal cell surface display and flow cytometry for postselectional characterization of affinity proteins in combinatorial protein engineering applications. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6714–6721 (2007).
 82. Löfblom, J. Bacterial display in combinatorial protein engineering. *Biotechnol J* **6**, 1115–1129 (2011).
 83. Mazor, Y., Van Blarcom, T., Mabry, R. & Iverson, B. L. Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in Escherichia coli. *Nature* (2007).
 84. Mazor, Y., Van Blarcom, T., Iverson, B. L. & Georgiou, G. Isolation of full-length IgG antibodies from combinatorial libraries expressed in Escherichia coli. *Therapeutic Antibodies* (2009).
 85. Mazor, Y., Van Blarcom, T., Carroll, S. & Georgiou, G. Selection of full-length IgGs by tandem display on filamentous phage particles and Escherichia coli fluorescence-activated cell sorting screening. *FEBS journal* **277**, 2291–2303 (2010).
 86. He, M. & Taussig, M. J. Eukaryotic ribosome display with in situ DNA recovery. *Nat Meth* **4**, 281–288 (2007).
 87. He, M. & Taussig, M. J. Ribosome display of antibodies: expression, specificity and recovery in a eukaryotic system. *J Immunol Methods* **297**, 73–82 (2005).
 88. Hanes, J. & Plückthun, A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 4937–4942 (1997).
 89. Dübel, S. *Handbook of Therapeutic Antibodies*. (Wiley-VCH, 2010).
 90. Gao, C., Mao, S., Lo, C. & Wirsching, P. Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proceedings of the* (1999).
 91. O'Brien, P. M. & Aitken, R. *Antibody Phage Display*. **178**, (Springer, 2002).
 92. Kehoe, J. W. & Kay, B. K. Filamentous Phage Display in the New Millennium. *Chem. Rev* **105**, 4056–4072 (2005).
 93. Bratkovic, T. Progress in phage display: evolution of the technique and its application. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 749–767 (2010).
 94. Glaser-Wuttke, G., Keppner, J. & Rasched, I. Pore-forming properties of the adsorption protein of filamentous phage fd. *Biochimica et Biophysica Acta* **985**, 239–247 (1989).
 95. Karlsson, F., Borrebaeck, C. A. K., Nilsson, N. & Malmberg-Hager, A. C. The Mechanism of Bacterial Infection by Filamentous Phages Involves Molecular Interactions between TolA and Phage Protein 3 Domains. *J Bacteriol* **185**, 2628–2634 (2003).
 96. Eckert, B., Martin, A., Balbach, J. & Schmid, F. X. Prolyl isomerization as a

- molecular timer in phage infection. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 619–623 (2005).
97. Li, Z., Koch, H. & Dübel, S. Mutations in the N-terminus of the major coat protein (pVIII, gp8) of filamentous bacteriophage affect infectivity. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 57–66 (2003).
 98. Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I. & Little, M. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* (1991).
 99. Marks, J., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. & Winter, G. Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. (1992).
 100. Zacher, A. N., Stock, C. A., Golden, J. W. & Smith, G. P. A new filamentous phage cloning vector: fd-tet. *Gene* **9**, 127–140 (1980).
 101. Hoogenboom, H. R. *et al.* Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research* **19**, 4133–4137 (1991).
 102. Garrard, L. J., Yang, M., O'Connell, M. P., Kelley, R. F. & Henner, D. J. Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *Biotechnology (NY)* **9**, 1373–1377 (1991).
 103. McCafferty, J., Hoogenboom, H. R. & Chiswell, D. Antibody engineering: a practical approach. *books.google.com* (1996).
 104. Chang, C. N., Landolfi, N. F. & Queen, C. Expression of antibody Fab domains on bacteriophage surfaces. Potential use for antibody selection. *The Journal of Immunology* **147**, 3610–3614 (1991).
 105. Dübel, S. & Reichert, J. M. *Handbook of therapeutic antibodies, 2nd Edition.* (Wiley-VCH, 2014).
 106. Iba, Y., Ito, W. & Kurosawa, Y. Expression vectors for the introduction of highly diverged sequences into the six complementarity-determining regions of an antibody. *Gene* **194**, 35–46 (1997).
 107. Krebber, A., Bornhauser, S. & Burmester, J. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *Journal of* 1–21 (1997).
 108. Haidaris, C., Malone, J., Sherrill, L. & Bliss, J. Recombinant human antibody single chain variable fragments reactive with *Candida albicans* surface antigens. *Journal of molecular biology* (2001).
 109. Bitinaite, J. *et al.* USERTM friendly DNA engineering and cloning method by uracil excision. *Nucleic Acids Research* **35**, 1992–2002 (2007).
 110. McCafferty, J., Fitzgerald, K. & Earnshaw, J. Selection and rapid purification of murine antibody fragments that bind a transition-state analog by phage display. *Applied biochemistry Biotechnology* (1994).
 111. GE Healthcare Life Sciences.
 112. de Haard, H., van Neer, N., Reurs, A. & Hufton, S. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *Journal of Biological* **274**, 18218–18230 (1999).
 113. Solforosi, L. *et al.* A phage display vector optimized for the generation of human antibody combinatorial libraries and the molecular cloning of monoclonal antibody fragments. *New Microbiol.* **35**, 289–294 (2012).
 114. Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A. & Benkovic, S. J. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7978–7982 (1991).
 115. Barbas, C. F. *Phage Display.* (Cold Spring Harbor Laboratory Pr, 2001).
 116. Tsurushita, N., Fu, H. & Warren, C. Phage display vectors for in vivo recombination of immunoglobulin heavy and light chain genes to make large combinatorial libraries. *Gene* (1996).
 117. Sblattero, D. & Bradbury, A. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nat Biotechnol* (2000).
 118. Garrard, L. J., Yang, M., O'Connell, M. P. & Kelley, R. F. Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *Nature* **9**, 1373–1377 (1991).

119. Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B. & Zardi, L. Design and use of a phage display library. *Journal of Biological ...* (1998).
120. Viti, F., Nilsson, F., Demartis, S., Huber, A. & Neri, D. Design and use of phage display libraries for the selection of antibodies and enzymes. *Meth Enzymol* **326**, 480–505 (2000).
121. Söderlind, E. *et al.* Chaperonin assisted phage display of antibody fragments on filamentous bacteriophages. *Biotechnology (NY)* **11**, 503–507 (1993).
122. Kobayashi, N., Söderlind, E. & Borrebaeck, C. A. K. Analysis of assembly of synthetic antibody fragments : Expression of functional scFv with predefined specificity. *BioTechniques* **23**, 500–503 (1997).
123. Jirholt, P., Ohlin, M., Borrebaeck, C. A. & Söderlind, E. Exploiting sequence space: shuffling in vivo formed complementarity determining regions into a master framework. *Gene* **215**, 471–476 (1998).
124. Efficient method for construction comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage. **21**, 4491–4498 (1993).
125. Dziegiel, M., Nielsen, L. & Andersen, P. Phage display used for gene cloning of human recombinant antibody against the erythrocyte surface antigen, rhesus D* 1. *Journal of* (1995).
126. Engberg, J. *et al.* Phage-display libraries of murine and human antibody Fab fragments. *Molecular Biotechnology* **6**, 287–310 (1996).
127. Morino, K. *et al.* Antibody fusions with fluorescent proteins: a versatile reagent for profiling protein expression. *J Immunol Methods* **257**, 175–184 (2001).
128. Díaz-Perales, A., Linacero, R. & Vázquez, A. M. New series of vectors for phage display and prokaryotic expression of proteins. *BioTechniques* (2001).
129. Zahn, G., Skerra, A. & Höhne, W. Investigation of a tetracycline-regulated phage display system. *Protein Eng* (1999).
130. Hust, M., Toleikis, L. & Dübel, S. Antibody phage display. *Handbook of therapeutic antibodies* (2007).
131. Hust, M. *et al.* A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *J Biotechnol* **152**, 159–170 (2011).
132. Hoogenboom, H. R. & Winter, G. By-passing immunisation: human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J Mol Biol* **227**, 381–388 (1992).
133. Griffiths, A. D. *et al.* Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *The EMBO Journal* **13**, 3245–3260 (1994).
134. Finnern, R., Pedrollo, E. & Fisch, I. Human autoimmune anti-proteinase 3 scFv from a phage display library. *Clinical & Experimental Immunology* (1997).
135. Rojas, G., Almagro, J. C., Acevedo, B. & Gavilondo, J. V. Phage antibody fragments library combining a single human light chain variable region with immune mouse heavy chain variable regions. *J Biotechnol* **94**, 287–298 (2002).
136. Den, W., Sompuram, S. & Sarantopoulos, S. A bidirectional phage display vector for the selection and mass transfer of polyclonal antibody libraries. *Journal of immunological Methods* (1999).
137. Expressing antibodies in Escherichia coli. (1995).
138. Baek, H., Suk, K.-H., Kim, Y.-H. & Cha, S. An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display. *Nucleic Acids Research* **30**, e18 (2002).
139. Goletz, S. *et al.* Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *J Mol Biol* **315**, 1087–1097 (2002).
140. Garrard, L. J. & Henner, D. J. Selection of an anti-IGF-1 Fab from a Fab phage library created by mutagenesis of multiple CDR loops. *Gene* **128**, 103–109 (1993).
141. Geoffroy, F., Sodoyer, R. & Aujame, L. A new phage display system to construct multicombinatorial libraries of very large antibody repertoires. *Gene* **151**, 109–113 (1994).
142. Pansri, P., Jaruseranee, N., Rangnoi, K., Kristensen, P. & Yamabhai, M. A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of

- antigens. *BMC Biotechnol.* **9**, 6 (2009).
143. Knappik, A. *et al.* Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* **296**, 57–86 (2000).
144. Hoet, R. M. *et al.* Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat Biotechnol* **23**, 344–348 (2005).
145. Christ, D., Famm, K. & Winter, G. Tapping diversity lost in transformations--in vitro amplification of ligation reactions. *Nucleic Acids Research* **34**, e108 (2006).
146. Lee, C. V., Sidhu, S. S. & Fuh, G. Bivalent antibody phage display mimics natural immunoglobulin. *J Immunol Methods* **284**, 119–132 (2004).
147. Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. **8**, R254 (2007).
148. Villa, A. *et al.* A novel synthetic naïve human antibody library allows the isolation of antibodies against a new epitope of oncofetal fibronectin. *MAbs* **3**, 264–272 (2011).
149. Akamatsu, Y., Cole, M. S., Tso, J. Y. & Tsurushita, N. Construction of a human Ig combinatorial library from genomic V segments and synthetic CDR3 fragments. *The Journal of Immunology* **151**, 4651–4659 (1993).
150. Li, J. *et al.* Human antibodies for immunotherapy development generated via a human B cell hybridoma technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 3557–3562 (2006).
151. A surface expression vector for antibody screening. **104**, 147–153 (1991).
152. Dübel, S., Breitling, F., Fuchs, P. & Braunagel, M. A family of vectors for surface display and production of antibodies. *Gene* (1993).
153. Martin Welschof, P., Sergey, M. & Diana, F. The antigen-binding domain of a human IgG-anti-F (ab')₂ autoantibody. *Proceedings of the* (1997).
154. Finlay, W. J. *et al.* Affinity maturation of a humanized rat antibody for anti-RAGE therapy: comprehensive mutagenesis reveals a high level of mutational plasticity both inside and outside the complementarity-determining regions. *J Mol Biol* **388**, 541–558 (2009).
155. Thie, H., Schirrmann, T., Paschke, M., Dübel, S. & Hust, M. SRP and Sec pathway leader peptides for antibody phage display and antibody fragment production in *E. coli*. *New Biotechnology* **25**, 49–54 (2008).
156. Glanville, J. *et al.* Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proceedings of the ...* (2009).
157. Sheets, M. D. *et al.* Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6157–6162 (1998).
158. O'Connell, D., Becerril, B. & Roy-Burman, A. Phage versus phagemid libraries for generation of human monoclonal antibodies. *Journal of molecular* **321**, 49–56 (2002).
159. Hussack, G. *et al.* A VL single-domain antibody library shows a high-propensity to yield non-aggregating binders. *Protein Engineering Design and Selection* **25**, 313–318 (2012).
160. Kwong, L. S. *et al.* Characterisation of antibodies to. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **139**, 313–318 (2011).
161. Vaughan, T., Williams, A. & Pritchard, K. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature* (1996).
162. Philibert, P. *et al.* A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnol.* **7**, 81 (2007).
163. Azriel-Rosenfeld, R., Valensi, M. & Benhar, I. A human synthetic combinatorial library of arrayable single-chain antibodies based on shuffling in vivo formed CDRs into general framework regions. *J Mol Biol* **335**, 177–192 (2004).
164. C F Barbas, 3., Bain, J. D., Hoekstra, D. M. & Lerner, R. A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem.

- Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 4457–4461 (1992).
165. Barbas, C. F., Amberg, W., Simoncsits, A., Jones, T. M. & Lerner, R. A. Selection of human anti-hapten antibodies from semisynthetic libraries. *Gene* **137**, 57–62 (1993).
 166. Chen, W., Zhu, Z., Feng, Y. & Dimitrov, D. S. A large human domain antibody library combining heavy and light chain CDR3 diversity. *Mol Immunol* **47**, 912–921 (2010).
 167. Pini, A. *et al.* Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 21769–21776 (1998).
 168. Desiderio, A. *et al.* A semi-synthetic repertoire of intrinsically stable antibody fragments derived from a single-framework scaffold. *J Mol Biol* **310**, 603–615 (2001).
 169. Söderlind, E. *et al.* Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nat Biotechnol* **18**, 852–856 (2000).
 170. Marks, J. D., Hoogenboom, H. R. & Bonner, T. P. By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of molecular* (1991).
 171. Marks, J., Griffiths, A. & Malmqvist, M. By-Passing Immunization: Building High Affinity Human Antibodies by Chain Shuffling. *Nature* (1992).
 172. Nissim, A., Hoogenboom, H. R. & Tomlinson, I. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *The EMBO ...* (1994).
 173. de Kruif, J., Boel, E. & Logtenberg, T. Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J Mol Biol* (1995).
 174. <http://www.morphosys.com> (August 2014)
 175. Lee, C. M. Y., Iorno, N., Sierro, F. & Christ, D. Selection of human antibody fragments by phage display. *Nature Protocols* (2007)
 176. Fellouse, F. A., Esaki, K., Birtalan, S. & Raptis, D. High-throughput generation of synthetic antibodies from highly functional minimalist phage-displayed libraries. *Journal of molecular Biotechnology* (2007)
 177. Tiller, T. *et al.* A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. *MAbs* **5**, 445–470 (2013).
 178. Parmley, S. & Smith, G. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* (1988).
 179. Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H.-J. & Reinard, T. The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. *J. Virol. Methods* **106**, 225–233 (2002).
 180. De Bruin, R., Spelt, K., Mol, J., Koes, R. & Quattrocchio, F. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nat Biotechnol* **17**, 397–399 (1999).
 181. Konthur, Z., Wilde, J. & Lim, T. S. Semi-automated magnetic bead-based antibody selection from phage display libraries. *Antibody Engineering* (2010).
 182. Schütte, M. *et al.* Identification of a Putative Crf Splice Variant and Generation of Recombinant Antibodies for the Specific Detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* **4**, e6625 (2009).
 183. Schirrmann, T., Al-Halabi, L., Dübel, S. & Hust, M. Production systems for recombinant antibodies. *Front Biosci* (2008).
 184. Skerra, A. & Plückthun, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. **240**, 1038–1041 (1988).
 185. Simmons, L. C. *et al.* Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *J Immunol Methods* **263**, 133–147 (2002).
 186. Hust, M. *et al.* Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnol.* **7**, 14 (2007).
 187. Shiroza, T. *et al.* Production of a single-chain variable fraction capable of inhibiting the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase in *Bacillus brevis*: construction of a chimeric shuttle plasmid secreting its gene product. *Biochimica et Biophysica Acta* **1626**, 57–64 (2003).
 188. Wu, S. C., Yeung, J. C., Duan, Y. & Ye, R. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound *Applied and ...* (2002).

189. Robinson, D. K. & Memmert, K. W. Kinetics of recombinant immunoglobulin production by mammalian cells in continuous culture. *Biotechnology and* (1991).
190. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**, 17–27 (1992).
191. Ward, E. S., Güssow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T. & Winter, G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* **341**, 544–546 (1989).
192. Mollova, S., Retter, I. & Müller, W. Visualising the immune repertoire. *BMC Systems Biology* (2007).
193. Williams, D. R. *The Funding of Biopharmaceutical Research and Development*. (Elsevier, 2013).
194. Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2014. *MAbs* (2013).
195. Reichert, J. M. Which are the antibodies to watch in 2012? *MAbs* **4**, 1–3 (2012).
196. Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2013: Mid-year update. *MAbs* (2013).
197. Jordan, E., Al-Halabi, L., Schirrmann, T., Hust, M. & Dübel, S. Production of single chain Fab (scFab) fragments in *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact* **6**, 38 (2007).
198. Schirrmann, T. *et al.* Oligomeric forms of single chain immunoglobulin (scIgG). *MAbs* **2**, 73–76 (2010).
199. Atwell, J. L. *et al.* scFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: length of the linker between VH and VL domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies. *Protein Eng Des Sel* **12**, 597–604 (1999).
200. Kortt, A. A. *et al.* Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer. *Protein Eng* **10**, 423–433 (1997).
201. Griffiths, A. D. *et al.* Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *The EMBO Journal* **12**, 725–734 (1993).
202. Honegger, A. in *Therapeutic Antibodies* **181**, 47–68 (Springer Berlin Heidelberg, 2008).
203. Borrebaeck, C. A. *et al.* Kinetic analysis of recombinant antibody-antigen interactions: relation between structural domains and antigen binding. *Biotechnology (NY)* **10**, 697–698 (1992).
204. Bessette, P. H., Åslund, F. & Beckwith, J. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. in (1999).
205. Little, M., Breitling, F., Micheel, B. & Dübel, S. Surface display of antibodies. *Biotechnology advances* (1994).
206. Hust, M. & Dübel, S. in *Immunochemical Protocols* 71–96 (Humana Press, 2005).
207. Kirsch, M., Zaman, M., Meier, D., Dübel, S. & Hust, M. Parameters affecting the display of antibodies on phage. *Journal of immunological* (2005).
208. Deml, L. *et al.* Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol* **75**, 10991–11001 (2001).
209. Raab, D., Graf, M., Notka, F., Schödl, T. & Wagner, R. The GeneOptimizer Algorithm: using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multiparameter DNA sequence optimization. *Syst Synth Biol* **4**, 215–225 (2010).
210. Welch, M. *et al.* Design Parameters to Control Synthetic Gene Expression in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* **4**, e7002 (2009).
211. Jäger, V. *et al.* High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* **13**, 52 (2013).
212. Welch, M., Villalobos, A., Gustafsson, C. & Minshull, J. You're one in a googol: optimizing genes for protein expression. *Journal of The Royal Society Interface* **6**, S467–S476 (2009).
213. Welch, M., Villalobos, A., Gustafsson, C. & Minshull, J. in *Synthetic Biology, Part B - Computer Aided Design and DNA Assembly* **498**, 43–66 (Elsevier, 2011).
214. Sudmant, P. H., Kitzman, J. O., Antonacci, F. & Alkan, C. Diversity of human copy number variation and multicopy genes. *Science* (2010).
215. Pennisi, E. Genomics. 1000 Genomes Project gives new map of genetic diversity.

- Science* **330**, 574–575 (2010).
216. Lefranc, M.-P. & Lefranc, G. *The Immunoglobulin FactsBook*. (Academic Press, 2001).
 217. Lefranc, M. P., Lefranc, G. & Rabbitts, T. H. Inherited deletion of immunoglobulin heavy chain constant region genes in normal human individuals. (1982).
 218. Hust, M. Construction of human antibody gene libraries and selection of antibodies by phage display. *Methods in molecular biology* (Clifton (2010).
 219. Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. & Winter, G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624–628 (1991).
 220. Little, M. *et al.* Generation of a large complex antibody library from multiple donors. *J Immunol Methods* **231**, 3–9 (1999).
 221. Løset, G. Å. *et al.* Construction, evaluation and refinement of a large human antibody phage library based on the IgD and IgM variable gene repertoire. *J Immunol Methods* **299**, 47–62 (2005).
 222. Miethe, S. *et al.* Development of neutralizing scFv-Fc against botulinum neurotoxin A light chain from a macaque immune library. *MAbs* **6**, 446–459 (2014).
 223. Chahboun, S. *et al.* Isolation of a nanomolar scFv inhibiting the endopeptidase activity of botulinum toxin A, by single-round panning of an immune phage-displayed library of macaque origin. *BMC Biotechnol.* **11**, 113 (2011).
 224. Non-human primate immune libraries combined with germline humanization: an (almost) new, and powerful approach for the isolation of therapeutic antibodies. **1**, 377–381 (2009).
 225. Som mavilla, R., Lovato, V., Villa, A., Sgier, D. & Neri, D. Design and construction of a naïve mouse antibody phage display library. *J Immunol Methods* **353**, 31–43 (2010).
 226. Sabir, J. S. M. *et al.* Construction of naïve camelids VHH repertoire in phage display-based library. *Comptes Rendus Biologies* **337**, 244–249 (2014).
 227. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580 (1983).
 228. Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. & Dübel, S. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol* (2001).
 229. Soltes, G. *et al.* On The Influence Of Vector Design On Antibody Phage Display. *J Biotechnol* **127**, 626–637 (2007).
 230. Kristensen, P. & Winter, G. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Folding and Design* **3**, 321–328 (1998).
 231. Meyer, T. *et al.* Isolation of scFv fragments specific to OmpD of *Salmonella Typhimurium*. *Veterinary Microbiology* **147**, 162–169 (2011).
 232. Walker, L. M., Bowley, D. R. & Burton, D. R. Efficient Recovery of High-Affinity Antibodies from a Single-Chain Fab Yeast Display Library. *J Mol Biol* **389**, 365–375 (2009).
 233. Kontermann, R., Dübel, S. *Antibody Engineering*. (Springer Verlag, 2010).
 234. Thie, H., Toleikis, L., Li, J. & Wasielewski, von, R. Rise and Fall of an Anti-MUC1 Specific Antibody. *PLoS ONE* (2011).
 235. Steinwand, M. *et al.* The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG. *MAbs* **6**, 204–218 (2014).
 236. Dyson, M. R., Shadbolt, S. P., Vincent, K. J., Perera, R. L. & McCafferty, J. Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol.* **4**, 32 (2004).
 237. Phage display selection of peptides possessing aldolase activity. **0**, 769–770 (2001).
 238. ørum, H. *et al.* Efficient method for construction comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage. *Nucleic Acids Research* **21**, 4491–4498 (1993).
 239. Skerra, A. & Plückthun, A. Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and cis-prolines. *Protein Engineering Design and Selection* **4**, 971–979 (1991).
 240. Corisdeo, S. & Wang, B. Functional expression and display of an antibody Fab fragment in *Escherichia coli*: study of vector designs and culture conditions. *Protein*

- Expression and Purification* **34**, 270–279 (2004).
241. Nielsen, B. L., Willis, V. C. & Lin, C.-Y. Western blot analysis to illustrate relative control levels of the lac and ara promoters in Escherichia coli. *Biochem Mol Biol Educ* **35**, 133–137 (2007).
 242. Somerville, J. E., Jr, Goshorn, S. C. & Fell, H. P. Bacterial aspects associated with the expression of a single-chain antibody fragment in Escherichia coli. *Applied microbiology* (1994).
 243. Knappik, A. & Plückthun, A. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng* **8**, 81–89 (1995).
 244. Hemmilä, I., Dakubu, S., Mikkala, V. M. & Siitari, H. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Analytical* (1984).
 245. A new europium chelate for protein labelling and time-resolved fluorometric applications. **21**, 173–178 (1988).
 246. Dueñas, M., Malmberg, A. C., Casavilla, R., Ohlin, M. & Borrebaeck, C. A. Selection of phage displayed antibodies based on kinetic constants. *Mol Immunol* **33**, 279–285 (1996).
 247. Ylera, F., Harth, S., Waldherr, D., Frisch, C. & Knappik, A. Off-rate screening for selection of high-affinity anti-drug antibodies. *Analytical Biochemistry* **441**, 208–213 (2013).
 248. Yuan, B., Schulz, P., Liu, R. & Sierks, M. R. Improved affinity selection using phage display technology and off-rate based selection. *Electronic Journal of Biotechnology* (2006).
 249. Lasonder, E. & Schellekens, G. A. A fast and sensitive method for the evaluation of binding of phage clones selected from a surface displayed library. *Nucleic Acids Research* (1994).
 250. Sun, W. *et al.* A combined strategy improves the solubility of aggregation-prone single-chain variable fragment antibodies. *Protein Expression and Purification* **83**, 21–29 (2012).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die Möglichkeit zur Promotion und die wissenschaftliche Betreuung, sowie für alle Unterstützungen und Anregungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Bode bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Vielen Dank auch an Herrn. Prof. Fleißner für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. André Frenzel, Herrn Dr. Thomas Schirrmann und Herrn Prof. Dr. Michael Hust danke ich besonders für ihre stetige fachliche Anregung und Diskussionsbereitschaft. Zudem gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe Dübel für ein freundliches Klima und tolle Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei Janna und meiner Familie bedanken. Ihr habt mich stets unterstützt und motiviert. Ich danke euch!